

**Der Keimblattapoplast von *Ricinus communis* L. –
Kinetische Wechselwirkungen zwischen
der Substratkonzentration und dem
Langstreckentransport**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
durch die Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth**

**vorgelegt von
Heike Bauer-Ruckdeschel, geb. Bauer
aus Erfurt**

Bayreuth, November 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis November 2001 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangen des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation.

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.11.2001

Zulassung durch die Promotionskommission: 20.12.2001

Wissenschaftliches Kolloquium: 01.07.2002

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Rösch

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Komor

Zweitgutachter: Prof. Dr. E. Steudle

*Anything that is alive is too complicated to be fully
comprehended by the human mind. Even the dead part of a plant
contains sufficient complications to exercise all our ingenuity.*

Canny, 1995

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Stoffaufnahme und Phloembeladung.....	1
1.2	Langstreckentransport im Phloem	2
1.3	Phloementladung im <i>sink</i>	3
1.4	Ionenaufnahme in die Wurzel und Xylembeladung.....	4
1.5	Langstreckentransport im Xylem und Xylementladung	5
1.6	Kopplung von Stoffflüssen und die Rolle des Blattapoplasten.....	6
1.7	Untersuchungsobjekt: <i>Ricinuskeimling</i>	7
2	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Anzucht der Pflanzen	9
2.2.1	Keimlinge.....	9
2.2.2	Adulte Ricinuspflanzen.....	9
2.3	Equilibrierungsversuche	10
2.3.1	Equilibrierung über den Keimblattapoplasten	10
2.3.2	Equilibrierung über den Wurzelapoplasten.....	10
2.4	Gewinnung der Exsudate	11
2.4.1	Siebröhrenexsudat.....	11
2.4.2	Wurzeldruckexsudat	12
2.5	Ernte der Gewebeproben.....	12
2.6	Analyse des Pflanzenmaterials.....	12
2.6.1	Bestimmung der Kohlenhydrate	12
2.6.1.1	Lösliche Zucker.....	12
2.6.1.2	Stärke.....	13
2.6.2	Enzymatische ATP-Bestimmung.....	14
2.6.3	Bestimmung der stickstoffhaltigen Verbindungen.....	14
2.6.3.1	Freie Aminosäuren	14
2.6.3.2	Nitrat	15
2.6.4	Messung von Kohlenstoff und Stickstoff.....	15
2.6.5	Bestimmung von Kalium, Phosphor, Schwefel und Natrium	16
2.6.6	Quantifizierung des freien Phosphats	16

2.6.7	Quantifizierung des freien Sulfats.....	16
2.7	Aufnahme- und Effluxmessungen.....	17
2.7.1	Bestimmung der unidirektionalen Stoffaufnahme in die Keimblätter	17
2.7.2	Bestimmung der unidirektionalen Effluxrate aus den Keimblättern.....	17
2.7.3	¹⁵ N-Nitrat-Aufnahme durch die Wurzel.....	18
2.7.4	Phosphat- und Sulfatefflux aus der Wurzel.....	18
2.8	Lokalisierung verschiedener Elemente in den Keimblättern	18
3	ERGEBNISSE	20
3.1	Methodischer Ansatz.....	20
3.1.1	Abschätzung der <i>in vivo</i> -Situation im apoplastischen Raum	20
3.1.2	Konzentrationen und Volumenflußraten im Phloem	21
3.1.3	Zirkulation zwischen Phloem und Xylem.....	22
3.1.3.1	Volumenflußraten im Xylem.....	22
3.1.3.2	Verunreinigungen im Wurzeldruckexsudat.....	23
3.2	Ferntransport von kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Substraten	25
3.2.1	Glutamintransport nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten.....	25
3.2.1.1	Konzentration in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat	25
3.2.1.2	Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem	26
3.2.1.3	Glutamin-Massenflußraten in Phloem und Xylem.....	28
3.2.1.4	Glutaminaufnahme in die Keimblätter und symplastischer Efflux	30
3.2.2	Auswirkungen des externen Glutamins auf den Stickstoffhaushalt.....	31
3.2.2.1	Freie Aminosäuren	31
3.2.2.2	Stickstofftransport	33
3.2.2.3	Freie Aminosäuren im Siebröhrenexsudat adulter Ricinuspflanzen	35
3.2.3	Vergleich des Ferntransports stickstoffhaltiger Verbindungen mit dem Ferntransport von Saccharose.....	36
3.2.4	Nitrattransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten.....	38
3.2.4.1	Nitrattransport im Xylem und Import in die Keimblätter.....	39
3.2.4.2	Vergleich des Langstreckentransports in Phloem und Xylem.....	41
3.2.4.3	Verbleib des über die Wurzel aufgenommenem Nitrats.....	42
3.2.5	Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten	43
3.2.6	Saccharosetransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten	44
3.2.7	Unterteilung des Keimlings in <i>source</i> und <i>sink</i> am Beispiel des Kohlenstoffhaushalts.....	45
3.2.8	Stickstoffverteilung im Hypokotyl.....	49
3.2.9	Wechselwirkungen zwischen der Saccharosekonzentration in den Keimblättern und der Kohlenstofftranslokation.....	49

3.2.9.1	Kohlenstofftransport nach fehlender apoplastischer Versorgung	50
3.2.9.2	Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter	52
3.2.10	Wechselwirkungen zwischen dem Glutaminstatus der Keimblättern und der Stickstofftranslokation	54
3.2.10.1	Stickstofftransport nach fehlender apoplastischer Versorgung	55
3.2.10.2	Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter	57
3.3	Ferntransport von K^+ -Ionen	58
3.3.1	Elementverteilung in den Keimblättern	58
3.3.2	Kaliumtransport nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten	59
3.3.2.1	Gehalt in den Keimblättern und Konzentration im Siebröhrenexsudat	60
3.3.2.2	Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem	61
3.3.2.3	Kaliumaufnahme aus dem apoplastischen Raum und symplastischer Efflux	62
3.3.2.4	Kalium-Massenflußraten in Phloem und Xylem	63
3.3.3	Kaliumtransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten	64
3.3.3.1	Kaliumtransport im Xylem und Import in die Keimblätter	64
3.3.3.2	Kaliumtransport nach Angebot von Konzentrationen typischer Standorte	66
3.3.4	Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten	69
3.3.5	Kaliumverteilung im Hypokotyl	69
3.3.6	Wechselwirkungen zwischen der Kaliumkonzentration in den Keimblättern und der Kaliumtranslokationsrate	70
3.3.6.1	Kaliumtransport nach fehlender apoplastischer Versorgung	70
3.3.6.2	Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter	71
3.3.7	Magnesium und Calcium	72
3.4	Phosphatferntransport	74
3.4.1	Phosphorverteilung in den einzelnen Kompartimenten der Keimblätter	74
3.4.2	Phosphattransport nach Equilibrierung über die Keimblätter	76
3.4.2.1	Freie Konzentration in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat	76
3.4.2.2	Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem	79
3.4.2.3	Phosphat-Massenflußraten in Phloem und Xylem	80
3.4.2.4	Phosphataufnahme in die Keimblätter und symplastischer Efflux	82
3.4.3	Phosphattransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten	83
3.4.3.1	Phosphattransport im Xylem und Import in die Keimblätter	83
3.4.3.2	Vergleich der Phosphatflüsse in Xylem und Phloem	85
3.4.4	Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten	86
3.4.5	Gleichzeitiges Angebot von Phosphat über die Keimblätter und die Wurzel	86
3.4.6	Phosphorverteilung im Hypokotyl	87
3.4.7	Phosphatfluß in den Wurzelapoplasten	88

3.4.8	Wechselwirkungen zwischen der Phosphatkonzentration in den Keimblättern und der Phosphortranslokation.....	88
3.4.8.1	Phosphortransport nach fehlender apoplastischer Versorgung.....	89
3.4.8.2	Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter.....	90
3.5	Sulfatferntransport	91
3.5.1	Schwefelverteilung in den einzelnen Kompartimenten der Keimblätter	91
3.5.2	Sulfattransport nach Equilibrierung über die Keimblätter	92
3.5.2.1	Freie Konzentration in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat	93
3.5.2.2	Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem	95
3.5.2.3	Sulfat-Massenflußraten in Phloem und Xylem	96
3.5.2.4	Sulfataufnahme in die Keimblätter und symplastischer Efflux.....	98
3.5.3	Sulfattransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten.....	99
3.5.3.1	Sulfattransport im Xylem und Import in die Keimblätter	99
3.5.3.2	Vergleich der Sulfatflüsse in Xylem und Phloem	101
3.5.4	Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten	102
3.5.5	Schwefelverteilung im Hypokotyl	102
3.5.6	Sulfatfluß in den Wurzelapoplasten	103
3.5.7	Wechselwirkungen zwischen der Sulfatkonzentration in den Keimblättern und der Schwefeltranslokation.....	104
3.5.7.1	Schwefeltransport nach fehlender apoplastischer Versorgung.....	104
3.5.7.2	Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter.....	105
3.6	<i>Myo</i> -Inositol, Natrium und Bor.....	106
4	DISKUSSION	109
4.1	Saccharose als Hauptkomponente des Kohlenstoffferntransports.....	109
4.1.1	Wechselwirkung zwischen der apoplastischen Saccharosekonzentration und dem Kohlenstoffhaushalt in den Keimblättern und im apikalen Hypokotyl.....	109
4.1.2	Ferntransport von löslichen Zuckern	110
4.2	Ferntransport stickstoffhaltiger Verbindungen	111
4.2.1	Glutaminaufnahme in die Keimblätter und der Weg zum Phloem	111
4.2.2	Glutaminzirkulation zwischen Phloem und Xylem	112
4.2.3	Nitrattransport im Xylem und Reduktion in der Wurzel.....	113
4.2.4	Zusammenspiel von Kohlenstoff und Stickstoff bei der Phloembeladung aus dem Apoplasten	114
4.3	K ⁺ als dominantes Kation im Phloem	115
4.3.1	Kaliumverteilung in den Keimblättern.....	115
4.3.2	Zirkulation von Kalium und die Phloembeladung als Kontrollpunkt	115

4.3.3	Rolle der apoplastischen Konzentration für den K^+ -Transport im Phloem.....	116
4.3.4	Speicherkapazität des Blattapoplasten	117
4.4	Phosphat als Hauptkomponente des Phosphorferntransports	118
4.4.1	Phosphorverteilung in den Keimblättern	118
4.4.2	Phosphataufnahme in die Keimblätter	118
4.4.3	Abschätzung der apoplastischen Phosphatkonzentration.....	119
4.4.4	Auswirkungen der apoplastischen Phosphatkonzentration auf den Ferntransport in Phloem und Xylem	120
4.4.5	Phosphattransport nach Angebot über die Wurzel.....	120
4.4.6	Phosphat-Homöostase in den Keimblättern.....	121
4.5	Sulfat als Hauptkomponente des Schwefelferntransports.....	122
4.5.1	Schwefelverteilung in den Keimblättern und Sulfataufnahme aus dem apoplastischen Raum.....	122
4.5.2	Sulfatferntransport – Zirkulation zwischen Phloem und Xylem.....	123
4.5.3	Sulfattransport nach Angebot über die Wurzel.....	124
4.5.4	Keimblätter oder Wurzel als Ort der Sulfatreduktion.....	124
4.6	Stoffliche Zusammensetzung des Blattapoplasten – Ausblick	125
4.7	Anhang.....	127
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	128
6	SUMMARY	130
7	LITERATURVERZEICHNIS	132

Abkürzungen

AFS	Apparent Free Space
ala	Alanin
arg	Arginin
AS	Aminosäuren
asn	Asparagin
asp	Asparaginsäure
cys	Cystein
EDXA	electron dispersive X-ray analysis
EELS	electron energy loss spectroscopy
ESI	electron spectroscopic imaging
FG	Frischgewicht
GABA	γ -Aminobuttersäure
gln	Glutamin
glu	Glutaminsäure
gly	Glycin
gsh	reduziertes Glutathion
GZ	Geleitzelle
his	Histidin
ile	Isoleucin
leu	Leucin
lys	Lysin
MES	2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure
met	Methionin
NMR	nuclear magnetic resonance
phe	Phenylalanin
ser	Serin
SR	Siebröhren
SRGZ	Siebröhren-Geleitzellen-Komplex
TG	Trockengewicht
thr	Threonin
trp	Tryptophan
tyr	Tyrosin
val	Valin
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

1 *Einleitung*

Das Wort und das Konzept *Apoplast* wurde in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts von dem Botaniker Münch (1930) geprägt. In seinen grundlegenden Arbeiten über den Assimilattransport beschrieb er zunächst den Symplasten als eine Einheit von lebenden Protoplasten. Durch eine semipermeable Membran abgegrenzt, ist der Symplast von den nichtlebenden, wasserleitenden Geweben -dem Hydrom- umgeben. Das Hydrom stellt in diesem Modell das Kompartiment dar, in dem Wasser aus dem *sink* wieder in den *source* (von der *Senke* zur *Quelle*) zurückkehrt, um erneut für den Phloemtransport zur Verfügung zu stehen. Schon Münch faßte das Hydrom und alle anderen toten Teile des Pflanzenkörpers unter dem Begriff *Apoplast* zusammen (Canny, 1995). Mittlerweile erfolgt eine detailliertere Unterteilung der apoplastischen Räume, da es sich gezeigt hat, daß es sich um verschiedene Räume mit sehr unterschiedlichen, physiologischen Aufgaben handelt. Zum Langstreckentransport dient das Lumen der ausdifferenzierten Xylemgefäße (Xylemlumen-Apoplast). Der frei zugängliche Apoplast zwischen den Wurzel- oder den Blattzellen wird *Freier Diffusionsraum (Apparent Free Space, AFS)* genannt. Aufgrund des Transportverhaltens für geladene Teilchen unterteilt man den AFS in zwei Teilräume. Im Wasserfreiraum (*Water Free Space*) diffundieren Ionen in der Lösung, die sich im Apoplasten befindet, während im Donnan-Freiraum (*Donnan Free Space*) Ionen durch festgelegte, negative Ladungen fixiert werden. Ferner gibt es die luftgefüllten interzellulären Räume, die ebenfalls dem Apoplasten zuzuordnen sind.

1.1 Stoffaufnahme und Phloembeladung

Pflanzen sind in der Lage anorganische Substanzen (v.a. CO₂ und H₂O) mit Hilfe von Strahlungsenergie (Licht) in organische Substanzen, die Assimilate, umzuwandeln. Diese photosynthetischen Reaktionen sind in speziellen Organellen, den Chloroplasten, lokalisiert und dienen nicht nur zur Versorgung der Zellen des Palisadenparenchyms, als bevorzugtem Ort der Photosynthese, sondern auch aller anderer Pflanzenteile. Aus dieser Spezialisierung ergibt sich eine besondere Bedeutung des Transports zwischen den verschiedenen Teilen der Pflanze. Den Ferntransport der Assimilate übernehmen die Siebröhren des Phloems. Über den Transport zu den Siebröhren gibt es zwei unterschiedliche Vorstellungen. Das *apoplastische Konzept* nimmt die Beladung der Siebröhren (SR) bzw. des Siebröhren-Geleitzellen-Komplexes (SRGZ-Komplex) direkt aus dem Interzellularraum an. Gelangen die Nährstoffe wiederum auf intrazellulärem Wege über Bündelscheide, Phloemparenchym und Geleitzelle in die Siebröhren spricht man von *symplastischer Phloembeladung*.

Der apoplastische Weg wurde seit den Versuchen von Geiger *et al.* (1974) zunächst als die bevorzugte Möglichkeit der Beladung angesehen. Die eigentliche Aufnahme von Saccharose in

die SR bzw. in den SRGZ-Komplex geschieht mittels Protonen-Cotransport (Giaquinta, 1983). Die dafür notwendigen Carrier an den Membranen der GZ bzw. der SR wurden mittlerweile nachgewiesen (Sauer, 1997). In den letzten Jahren kam es jedoch auch zu Zweifeln an dem Konzept der rein apoplastischen Phloembeladung. Gamalei (1991) untersuchte eine Vielzahl von Pflanzenarten aus unterschiedlichen taxonomischen Gruppen hinsichtlich ihrer *minor vein*-Konfiguration und unterteilte sie anhand der Plasmodesmenanzahl zwischen dem *minor vein*-Phloem und den umgebenden Zellen. Er konnte zeigen, daß v.a. bei Bäumen und/oder bei Pflanzen aus dem tropischen und subtropischen Regionen der Erde, ein symplastisches Kontinuum zwischen dem Mesophyll und den Siebröhren existiert. Ferner ließen Versuche, in denen zwischen der Beladung von externer und endogener Saccharose unterschieden wurde, auf eine symplastischen Beladung schließen (Madore und Lucas, 1987). Die Akkumulation der Stoffe muß in diesem Fall schon im Mesophyll stattfinden. Nur dadurch kann es zu den hohen Stoffkonzentrationen in den Siebelementen kommen. Um einen Rückfluß der Saccharose aus den SR bzw. dem SRGZ-Komplex zu verhindern, wird sie bei einigen Pflanzenarten in den Geleitzellen zu Raffinose und Stachyose umgewandelt (Polymer-Fallen-Modell: Turgeon, 1996). D.h. um den Gradienten zu den SR aufrecht erhalten zu können, werden Zucker-Polymere gebildet, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr durch die Plasmodesmen ins Mesophyll zurückgelangen können.

Für extern angelieferte Nährstoffe gibt es noch eine weitere Möglichkeit der Unterteilung der Phloembeladungswege. Es ist denkbar, daß Nährstoffe nach Aufnahme ins Mesophyll erneut in den Apoplasten freigesetzt werden. Diese Möglichkeit bezeichnet man als indirekt apoplastische Phloembeladung (Orlich und Komor, 1992) oder *by-pass feeding* (Van Bel, 1987). Experimente mit Ricinuskeimlingen haben gezeigt, daß mindestens die Hälfte der externen, an den Keimblättern angebotenen Saccharose direkt aus dem Apoplasten beladen wird, andere Teile jedoch erst nach Umweg über das Mesophyll (Orlich und Komor, 1992). Ob es sich dabei um eine metabolisch-kontrollierte Abgabe in den Apoplasten handelt oder um ein *Lecken* aus den Zellen ist unklar. Die apoplastische Phloembeladung könnte somit auch Folge eines *leakage-retrieval cycle* sein (Madore und Lucas, 1987; Van Bel, 1989).

1.2 Langstreckentransport im Phloem

Im Laufe der Evolution hat sich in den Kormophyten für den Langstreckentransport ein besonderes Gewebesystem entwickelt, das zu einzelnen Strängen zusammengefaßt vorliegt. Diese Leitbündel umfassen das Phloem und das Xylem, zwei Gewebetypen mit im Hinblick auf den Langstreckentransport unterschiedlichen Aufgaben. Das Phloem übernimmt den Transport von Assimilaten von den *source*- zu den *sink*-Regionen der Pflanze, während das Xylem v.a. für den Wassertransport zuständig ist.

Zur Erklärung des Phloemtransports an sich existieren mehrere Modelle, wobei sich v.a. die 1930 von Münch aufgestellte Druckstromtheorie durchgesetzt hat (siehe aber auch Eschrich, 1984). Der dem Phloemtransport zugrunde liegende Mechanismus der Massenströmung findet seine Ursache in einem Gradienten zwischen dem Wasserpotential der Siebröhren und dem des Apoplasten. Durch die aktive Beladung der Siebröhren in der *source*-Region steigt die osmotische

Konzentration, es kommt dadurch zu einer osmotischen Wasseraufnahme und zu einem erhöhten Druck (Turgor). Im *sink* werden die Siebröhren entladen. Das führt auf entgegengesetzte Weise zu einem niedrigeren osmotischen Potential und schließlich zu einem geringeren Druckpotential an dieser Stelle. Es folgt ein Druckausgleich zwischen Beladungs- und Entladungsort durch Massenströmung entlang des Druckpotentialgradienten, wobei ein Zusammenhang zwischen dem Druckpotential und den Anteilen an aktiv transportierten Stoffen besteht (Münch, 1930, zitiert aus Christy und Ferrier, 1973).

Die Hauptbestandteile des Phloeminhaltes Höherer Pflanzen sind Zucker, deren Anteil bis zu 80 % des Trockengewichtes des Phloemsafts ausmachen kann (Hall und Baker, 1972). Die meisten Pflanzen transportieren Saccharose, manche dagegen auch die Oligosaccharide der Raffinosefamilie (Richardson *et al.*, 1982), auch Zuckeralkohole wurden gefunden (Zimmermann und Ziegler, 1975). Stickstoff wird v.a. in Form freier Aminosäuren transportiert (Schobert und Komor, 1989). Unter den anorganischen Kationen dominiert Kalium, Konzentrationen bis zu 100 mM wurden gemessen (Vreughdenhil und Koot-Gronsveld, 1989; Zhong *et al.*, 1998). Anionen wie Phosphat-, Sulfat- oder Kationen wie Natrium-Ionen kommen dagegen üblicherweise in einer Konzentration von weniger als 10 mM vor (Hall und Baker, 1972; Hayashi und Chino, 1985; Zhong, 1994). Auch organische Phosphor- und Schwefelverbindungen wurden nachgewiesen (Geigenberger *et al.*, 1993; Komor *et al.*, 1996). Eine gute Phloemmobilität zeigen Magnesium-Ionen (Zhong *et al.*, 1993), eine geringere freie Calcium-Ionen (Brauer *et al.*, 1998). Nitrat scheint im Phloem nahezu immobil zu sein (Ziegler, 1975; Schobert und Komor, 1992; aber auch Schurr, 1991). Außerdem werden u.a. organische Säuren (Schurr, 1991), Ricinin (Holfelder *et al.*, 1998), Polyamine (Antognoni *et al.*, 1998), Glykolysemetaboliten (Geigenberger *et al.*, 1993) sowie ATP (Hall und Baker, 1972) und Phytohormone (Komor *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1996) translokiert.

1.3 Phloementladung im *sink*

Für die Phloementladung in den *sink*-Organen bestehen wiederum zwei, nach Patrick (1997) drei Möglichkeiten: 1.) symplastisch, 2.) symplastisch, jedoch durch einen apoplastischen Schritt unterbrochen oder 3.) apoplastisch. Tatsächlich scheint bei jungen wachsenden Geweben das Phloem vorwiegend auf symplastischem Wege über cytoplasmatische Verbindungen (den Plasmodesmen) entladen zu werden. Schulz (siehe Patrick, 1997) folgerten dies z.B. daraus, daß in Wurzelspitzen die Plasmamembran-Oberfläche des Protophloems nicht ausreicht, die beobachteten Saccharose-Importraten zu decken. Auch in elongierenden Geweben ist die Existenz einer rein symplastischen Entladung des Phloems nachgewiesen worden. In einzelnen Fällen kommt auch ein symplastischer Transport nach einem Transmembran-Transport zwischen den Membranen der SR bzw. des SRGZ-Komplexes und den *sink*-Zellen vor. Saccharose gelangt dabei zunächst in den Apoplasten und wird von dort carrier-vermittelt (Saccharose/Protonen-Cotransport) wieder in die Zellen (Symplasten) aufgenommen (Grimm *et al.*, 1990).

Im Zusammenhang mit der apoplastischen Phloementladung spricht man vom *pump-leak-model* (Patrick, 1990). Auch hier wird die Saccharose aus den SR bzw. dem SRGZ-Komplex

zunächst in den Apoplasten entlassen, dort aber durch das apoplastische Enzym Saure Invertase in die Hexosen gespalten (Eschrich, 1980; Roitsch *et al.*, 1995). Die Hexosen werden dann mittels Hexose-Carrier über die Membranen der *sink*-Zellen aufgenommen (Sauer *et al.*, 1990; Miller und Chourey, 1992). Der jeweils dominierende Mechanismus scheint von der Stoff- bzw. Zuckerkonzentration im Apoplasten abhängig zu sein (Hayes *et al.*, 1987; Porter *et al.*, 1987).

Die Entladung des Phloems stellt neben der Stoffaufnahme und der Phloembeladung in einen möglichen Kontrollpunkt für die optimale Stoffverteilung in der Pflanze dar. Notwendig dafür ist jedoch die Existenz eines Regulationsmechanismus, der auf die Phloembeladung zurückwirkt. Fehlt dieses *feedback*, würde sich ein Stoff im Phloem anreichern, wenn sich Be- und Entladungsrate nicht entsprächen. Findet die Regulation erst durch selektive Stoffaufnahme in die wachsenden Zellen der *sink*-Organe statt, muß der Verbleib der im Übermaß angelieferten Substrate geklärt werden. Vorstellbar ist, daß diese Nährstoffe innerhalb des Xylems zurück zum Beladungsort transportiert werden, so daß ein beständiger Kreislauf von Nährstoffen in der Pflanze erfolgt.

1.4 Ionenaufnahme in die Wurzel und Xylembeladung

Nährsalze gelangen üblicherweise über die Wurzel in die Pflanze. Sie können z.B. aus der Bodenlösung in den Apoplasten der Epidermis diffundieren. Der weitere apoplastische Weg ist jedoch nur bis zu den Radialwänden der Endodermiszellen ungehindert passierbar. Der Extrazellularraum ist dort durch die Ablagerung von Suberin und/oder Lignin im interfibrillären Räumen der Zellwände modifiziert (Steudle & Peterson, 1998). Der weitere Nährstofftransport in den Zentralzylinder kann aufgrund dieser besonderen Struktur, den Caspary-Streifen, nur symplastisch erfolgen. Es muß spätestens dort, aber auch schon auf dem Weg dorthin, ein Übertritt der Stoffe in das Innere der Zellen erfolgen. D.h. der Stofftransport in den Zentralzylinder der Wurzel erfolgt in allen Fällen auf symplastischem Wege. Der für Wasser beschriebene transzelluläre Transport, eine weitere Möglichkeit der Passage der Wurzel bzw. des Caspary-Streifens, spielt für Nährstoffteilchen keine Rolle. Eine zusätzliche Besonderheit des Wassertransports ist es, daß man den Caspary-Streifen mittlerweile nicht mehr als strikte Barriere für den apoplastischen Weg ansieht. Bei jungen Wurzeln konnte ein schneller apoplastischer Wassertransport gezeigt werden (Peterson *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1994). Besonders durchlässig scheint der Apoplast an den Bildungsorten von Seitenwurzeln (Peterson *et al.*, 1981) zu sein.

Das ausdifferenzierte Xylem, als totes Gewebe, wird definitionsgemäß dem Apoplasten zugerechnet. Um in diese Leitungsbahn zu kommen, müssen die Stoffe aus dem Symplasten in den Apoplasten übertreten. Den ursprünglichen Vorstellungen zufolge handelte es sich hierbei um ein passives *leakage* (Craft und Boyer, 1938). Unterdessen geht man davon aus, daß auch die Beladung des Xylems über Protonenpumpen und damit stoffwechselabhängig verläuft (De Boer *et al.*, 1985; Mizuno *et al.*, 1994). Arbeiten an isolierten Protoplasten aus dem Bereich des Xylemparenchyms (Wegner und Raschke, 1994; Wegner und De Boer, 1999; Köhler und Raschke, 2000) haben gezeigt, daß die Beladung der Nährsalze über Ionenkanäle erfolgt. Es liegt die

Vermutung nahe, daß der dafür nötige elektrochemische Gradient über die bereits erwähnten Protonenpumpen erzeugt wird. Somit sind die Aufnahme von Nährionen aus der Bodenlösung in den Symplasten und deren Wiederabgabe in den Apoplasten des Xylems der Kontrolle zweier separater Mechanismen unterworfen. Diese Trennung ist sowohl hinsichtlich der Selektivität des Stofftransports in den Sproß als auch bei der Regulation der Aufnahmerate am Plasmalemma der Wurzel von Bedeutung (Herschbach und Rennenberg, 1994).

1.5 Langstreckentransport im Xylem und Xylementladung

Der durch die Transpiration bedingte Wasserverlust der Pflanze erzeugt einen Sog. Dieser Unterdruck wird basipetal im Gefäßsystem weitergeleitet, wobei durch die Kohäsion der Wassermoleküle ein kontinuierlicher Wasserfaden über die Blätter, in die Wurzel und bis in den Boden bis in die Blätter resultiert. Der Wasserferntransport ist somit ein passiver Prozeß, d.h. im Xylem fließt das Wasser spontan entlang eines hydrostatischen Druckgradienten (Passioura, 1988). Diese Überlegungen sind die Grundlage der Kohäsionstheorie. Veröffentlicht wurde diese Theorie erstmals von Böhm im Jahre 1893. Meist wird jedoch die weiter verbreitete englischsprachige Arbeit von Dixon (1914) zitiert. Auch bei Pflanzen, die nicht oder nur wenig transpirieren, findet man einen Wasserfluß im Xylem. Als Ergebnis des aktiven Ionentransports in das Xylem und des Phloemtransports entsteht ein nach oben gerichteter Überdruck, der Wurzeldruck. Die Caspary-Streifen in den Radialwänden der Endodermis verhindern den Abfluß der Lösungen durch die Zellwände und sind damit wichtige Voraussetzung für den Aufbau und Erhalt dieses Druckes im Xylem. Nachweisbar ist der Wurzeldruck durch das Austreten von wäßrigem Exsudat aus der Schnittstelle (Tanner und Beevers, 1990; Pitman, 1982).

Der Xyleminhalt enthält aus dem Boden aufgenommene Nährelemente und trägt wesentlich zur Verteilung dieser in der ganzen Pflanze bei. Es sind v.a. anorganische Ionen, es kommen aber auch organische Substanzen vor. Nitrat stellt bei adulten Ricinuspflanzen mit z.T. über 80 % (Schurr, 1991) den größten Anteil der Anionen dar, gefolgt von Phosphat und Sulfat (Russell und Shorrocks, 1959), während Kalium bei den Kationen überwiegt (*Ricinus communis*: Bowling und Weatherley, 1965; Schurr, 1991). Bei den organischen Verbindungen dominieren stickstoffhaltige Substanzen wie Aminosäuren und Alkaloide (Schobert und Komor, 1989). Es kommen aber auch kleine Mengen an Kohlenhydraten (Schobert und Komor, 1990; Köckenberger, 1995) und organischen Säuren (Schurr, 1991) vor.

Die Xylementladung oder *scavenging* ist bislang noch wenig untersucht. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise, daß Stoffe, die über das Xylem in den Blattapoplasten gelangen, von dort aus aktiv in die Zellen aufgenommen werden (Marschner, 1995). Canny (1988) konnte zeigen, daß Protonenpumpen für die Aminosäuren-Aufnahme aus dem Apoplasten verantwortlich sind. Ähnliches fanden auch Wilson *et al.* (1988). Die Aufnahme von Ionen scheint durch Protonen-Anionen-Cotransport und durch Kationen-Protonen-Antiport zu erfolgen (De Boer *et al.*, 1985). Ionen können aber auch über Ionenkanäle ohne direkte Kopplung mit H^+ in die Zellen gelangen (Long und Widders, 1990; Wolf *et al.*, 1990).

1.6 Kopplung von Stoffflüssen und die Rolle des Blattapoplasten

Schon Münch (1930) nahm eine Kopplung zwischen Phloem und Xylem und in Verbindung damit eine Zirkulation des Wassers in diesen beiden Leitbahnen an. Tanner und Beevers (1990) beriefen sich auf diese Wasserzirkulation, um den von ihnen beobachteten Ionentransport im Xylem von Maispflanzen, der auch bei stark eingeschränkter Transpiration stattfand, zu erklären. Pate (1975) verdeutlichte durch seine Experimente, daß das Phloem und das Xylem in der Pflanze nicht nur über den Wasserfluß sondern auch über den Nährstofffluß miteinander verbunden sind (auch Pate *et al.*, 1979; Pate *et al.*, 1983; Jeschke *et al.*, 1986). Durch Bilanzierungen der Stoffflüsse im gesamten Organismus konnte er zeigen, daß eine Zirkulation von Nährstoffen in den untersuchten Pflanzen erfolgen muß. Mit dem gleichen experimentellen Ansatz wurde dieser Vorgang auch für adulte *Ricinus communis*-Pflanzen demonstriert (Jeschke und Pate, 1991a,b,c). Köckenberger *et al.* (1997) wies mittels nicht-invasiver NMR-Messungen einen Zusammenhang zwischen Flußrate und -geschwindigkeit im Phloem und Xylem von Ricinuskeimlingen nach, der auf die Existenz zumindest einer internen Wasserzirkulation hindeutet. Es stellt sich die Frage nach dem Ausmaß und der Funktion dieser Nährstoffzirkulation.

Assimilate werden in den photosynthetisch aktiven Zellen der Blätter produziert und über das Phloem in den *sink* translokiert. Untersuchungen des Xyleminhaltes verschiedener Pflanzenarten zeigen keinen nennenswerten Transport von Zuckern im Xylem (*Ricinus communis* siehe z.B. Schurr, 1991, aber auch Schobert und Komor, 1990). Zucker scheinen kaum in der Pflanze zu zirkulieren. Cataldo *et al.* (1988) gehen hingegen davon aus, daß es sich bei 15 % der im Xylem transportierten organischen Verbindungen um Zucker handelt. Nach Untersuchungen der Stickstoffflüsse besteht die einhellige Meinung, daß große Mengen stickstoffhaltige Verbindungen zwischen den verschiedenen Teilen der Pflanze translokiert werden, wobei eine Abhängigkeit von der jeweiligen N-Quelle existiert. Ammonium-Ionen und freie Aminosäuren können direkt in den Stoffwechsel einfließen, während Nitrat zuerst reduziert werden muß. Die Nitratreduktion kann sowohl in der Wurzel als auch in den Blättern erfolgen. Wird Nitrat in den Blättern reduziert, muß zunächst ein Transport zu den Blättern und darauf folgend ein Rücktransport der Produkte in die Wurzel stattfinden (Marschner *et al.*, 1997). Interessanterweise zirkulieren auch in Pflanzen, in denen die NO_3^- -Reduktion v.a. in der Wurzel lokalisiert ist, große Mengen an Aminoverbindungen (Jeschke und Pate, 1991b).

Kalium erfüllt in der Pflanze v.a. osmotische Zwecke und dominiert unter den anorganischen Ionen des Phloemexsudats (Smith und Milburn, 1980a,b,c; Vreughdenhil und Koot-Gronsveld, 1989). Ein Grund für den Transport sowohl im Phloem als auch im Xylem scheint seine Beteiligung an der Saccharosebeladung in den Blättern zu sein. Eine hohe apoplastische Kaliumkonzentration stimuliert den Saccharoseefflux aus den Mesophyllzellen und somit die apoplastische Beladung von Saccharose (Schobert *et al.*, 1998). Desweiteren ist Kalium für die Aufrechterhaltung des transmembranen elektrischen- und pH-Potentials an den Membranen der Siebelemente mitverantwortlich (Riesmeier *et al.*, 1994). Auch Phosphat- und Magnesium-Ionen sind für das *Funktionieren* der Protonen-ATPase in der Membran der Geleitzellen und/oder der Siebröhren (Marschner *et al.*, 1997), genauer für die Bildung von ATP, von Bedeutung. Sie müssen ebenfalls zurück zur Beladungsstelle des Phloems gelangen.

Zwischen dem Sulfat- und dem Nitrattransport bestehen auffällige Parallelen. Die Aufnahme von Sulfat erfolgt üblicherweise über die Wurzel, die Reduktion findet jedoch in den Blättern statt. Der aufgenommene Schwefel muß folglich zunächst über das Xylem in die Blätter translokiert werden, um nach Reduktion in den Blättern und Export über das Phloem für die Ernährung der Wurzel zur Verfügung zu stehen (Larsson *et al.*, 1991). Schwefel wird im Phloem zum größten Teil in organischer Form transportiert (Komor *et al.*, 1996).

1.7 Untersuchungsobjekt: *Ricinuskeimling*

Das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit ist der, auf nährstofffreiem Medium angezogene, sechs Tage alte Keimling von *Ricinus communis* L.. Die sich am Embryo entwickelnden Keimblätter sind fest vom Endosperm umschlossen. Alle Nährstoffe, die der Keimling in den ersten Tagen seines Wachstums benötigt, werden ausschließlich von diesem Nährgewebe bereitgestellt. Nach der Mobilisierung werden sie in den apoplastischen Raum zwischen den Endospermzellen und der Unterseite der Keimblätter entlassen. Da keine zelluläre Verbindung zwischen den Keimblättern und dem Endosperm besteht, erreichen die Stoffe zunächst auf apoplastischem Wege die Keimblätter. Das Endosperm läßt leicht abpräparieren und ist durch ein künstliches Medium (künstliche Apoplastenlösung) ersetzbar (Kallarackal *et al.*, 1989). Dazu kommt, daß die Keimblätter in diesem Alter auf der Blattunterseite noch nicht von einer vollständig ausgebildeten Kutikula überzogen sind. Die Nährstoffaufnahme kann somit über die gesamte Blattunterseite erfolgen.

Der sechs Tage alte *Ricinuskeimling* besitzt Keimblätter in denen die Leitbündel bereits vollständig ausgebildet sind, ebenfalls das Schwammparenchym, noch nicht hingegen die Chloroplasten des Palisadenparenchyms. (Köhler, 1992). Im Siebröhrenexsudat findet man vorwiegend Saccharose und freie Aminosäuren, wobei Glutamin mengenmäßig überwiegt (Kriedemann und Beevers, 1967a,b; Schobert und Komor, 1989) und als anorganische Ionen v.a. Kalium-, Sulfat-, und Phosphat-Ionen (Komor *et al.*, 1996). Da das Durchschneiden der Siebröhren von *Ricinus communis* L. zur Exsudation des Siebröhreninhalts führt und die Keimblätter aus einem wäßrigen Medium Nährstoffe aufnehmen können, kann der Zusammenhang zwischen der Aufnahme in die Keimblätter und dem Export über das Phloem bestimmt werden. Nach Anschneiden des Hypokotyls können die Siebröhren durch Calcium-Ionen geschlossen werden (Kauss, 1987). Das danach aus der basalen Schnittstelle austretende Wurzeldruckexsudat kann gesammelt und analysiert werden.

Die stoffliche Zusammensetzung der apoplastischen Lösung (ersetzbar durch eine künstliche Apoplastenlösung) ist somit Ausgangs- und Endpunkt mehrerer in gegensätzliche Richtungen verlaufender Flüsse. Ziel dieser Arbeit war die Bilanzierung dieser Flüsse.

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Flüsse und Konzentrationen herrschen im Phloem und im Xylem bei bestimmten apoplastischen Nährstoffkonzentrationen?
- Bei welchen Flüssen (und Konzentrationen) über das Xylem erhält man die gleichen Flüsse im Blattapoplasten wie bei Equilibrierung über das Blattmedium?
- Bei welchen apoplastischen Konzentrationen kommt es zu einer nennenswerten Zirkulation über Phloem und Xylem?
- Bei welchen symplastischen Nährstoffkonzentrationen im Blatt stellt der Symplast noch Nährstoffe für den Export zur Verfügung?

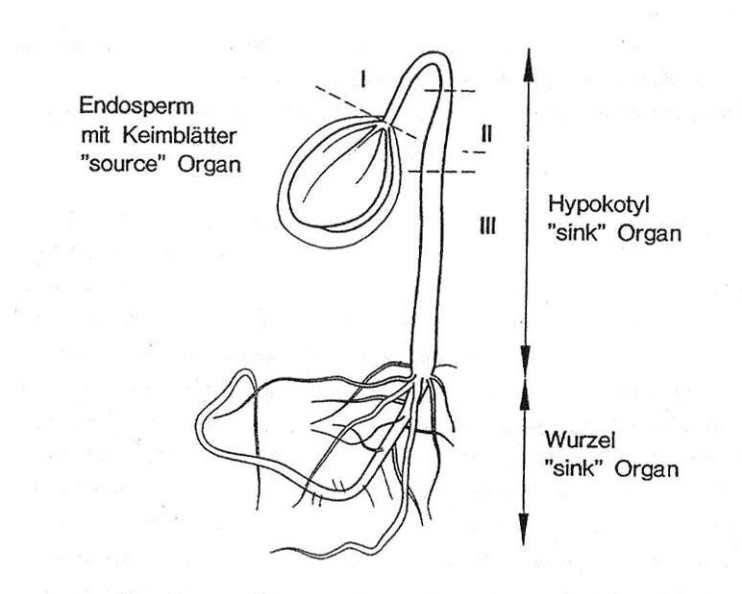


Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines sechs Tage alten Ricinuskeimlings
(I. apikales Hypokotyl, II. Verdickungszone, III. basales Hypokotyl).

2 *Material und Methoden*

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders angegeben, analytisch rein von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Anzucht der Pflanzen

2.2.1 Keimlinge

Samen von *Ricinus communis* L. (Jelitto Staudensamen GmbH, Schwarmstedt) wurden 18 h in vollentsalztem (VE)-Wasser eingeweicht. Am folgenden Tag sterilisierte man die Oberfläche 10 Minuten in 0,3 %iger Chinosol-Lösung (8-Hydroxy-Chinolin-Sulfat) und wusch dreimal mit sterilem Wasser. Die Keimung der Samen erfolgte zunächst auf 2 %igem (w/v) Agar. Nach Tag 3 wurden die Keimlinge auf die Auflagegitter steriler, mit 0,5 mM CaCl_2 -Lösung gefüllter Anzuchtgefäße übertragen. Das weitere Wachstum bis Tag 6 geschah unter stetiger Belüftung der CaCl_2 -Lösung. Die einzelnen Inkubationsschritte fanden bei 27 °C im Dunkeln statt.

2.2.2 Adulte Ricinuspflanzen

Die Keimung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Nach Tag 6 wurden die Pflanzen in einer Klimakammer (York International, GB) mit einem Hell- zu Dunkelrhythmus von 13,5/10,5 h, bei einer Temperatur von 24/20 °C gehalten. Die Taupunkttemperatur betrug 19/16 °C, das Wasserdampfsättigungsdefizit Δw lag somit bei 8,3/3,8 Pa $\text{kPa}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Strahlungsintensität während der Hellphase erreichte 650 $\mu\text{Mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als Wurzelmedium diente mit VE-Wasser gewaschener Quarzsand der Körnung 0,7-1,2 mm. Zur anfänglichen Vermeidung einer Überdüngung, wurde zwischen Tag 7 und Tag 10 mit 500 ml 1:1-verdünnter Nährlösung gegossen. Ab dem elften Tag bekamen die Pflanzen 500 ml unverdünnte Nährlösung. Am 18. Tag wurden sie von 1 l- auf 4 l-Töpfe übertragen und nun mit 1000 ml Nährlösung gegossen. Noch anhaftende Endospermreste wurden am Tag 8 entfernt. Am zehnten Tag wurden die Pflanzen der vollen Lichtintensität ausgesetzt. Gegossen wurde jeweils in der ersten Hälfte der Lichtphase, die Ernte der Proben erfolgte zu Beginn der zweiten Hälfte der Lichtphase.

Nährlösung nach Hoagland*, Spurenelemente nach Epstein (1972):			
Makroelemente	4 mM CaSO ₄	Spurenelemente	20 µM H ₃ BO ₃
	2 mM MgSO ₄		2 µM MnSO ₄
	3 mM K ₂ HPO ₄		2 µM ZnSO ₄
	6 mM NH ₄ NO ₃		0,5 µM CuSO ₄
	20 µM Fe-EDTA		0,5 µM MoO ₃
	50 µM KCl		
mit 7,1 % H ₂ SO ₄ auf pH 6,0 gebracht			
*siehe Down und Hellmers (1975)			

2.3 Equilibrierungsversuche

2.3.1 Equilibrierung über den Keimblattapoplasten

Die Unterseite der Keimblätter besitzt im Alter von sechs Tagen noch keine vollständig ausgebildete Kuticula. Es ist somit möglich, die Zusammensetzung der Apoplastenlösung gezielt zu manipulieren. Dazu wurde das Endosperm entfernt und die freigelegten Keimblätter für definierte Zeiträume in dem jeweiligen Medium inkubiert. Zur Verhinderung einer Anaerobiose der Keimblätter wurde das Inkubationsmedium gerührt. Die Wurzel war während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ eingetaucht. Zur Bestimmung der Vergleichswerte (0 Stunden) wurde das Endosperm nicht entfernt. Als Ausgangsmittel diente eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl₂ und 5 mM MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure). Der Puffer wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt und enthielt somit 1,5 mM K⁺. Die Inkubation fand in einer Exsudationskammer (Julabo U3, Julabo, Seelbach) statt, die mit einer Plexiglashaube verschlossen war. Diese Apparatur gewährleistete eine konstante Temperatur von 27 °C und eine hohe Luftfeuchtigkeit.

2.3.2 Equilibrierung über den Wurzelapoplasten

Für diese Versuche inkubierte man die Wurzel intakter Keimlinge in einem Medium aus 0,5 mM CaCl₂ und 1 mM MES(KOH) pH 5,0, dem das zu betrachtende Substrat zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte in einer Exsudationskammer (vgl. Abschnitt 2.3.1). Damit das Wurzelmedium als einzige Nährstoffquelle dienen konnte, wurde den Keimlingen das Endosperm entfernt. Die Keimblätter tauchten während des gesamten Versuchszeitraums in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl₂ und 5 mM MES(KOH) pH 5,5 ein.

2.4 Gewinnung der Exsudate

2.4.1 Siebröhrenexsudat

Die Keimlinge wurden zur Gewinnung von Siebröhrenexsudat am Hypokotyl im Bereich des Hakens mit einer Rasierklinge durchtrennt. Die Hypokotylstümpfe mit den Keimblättern wurden erneut in die Exsudationskammer übertragen und verblieben dort bis zum Ende der Probenahme. Mit graduierten Glaskapillaren (Brand, Reutlingen) konnte nun das Siebröhrenexsudat von den Hypokotylstümpfen abgenommen werden. Zur Bestimmung der Volumenflußrate wurde das pro Zeiteinheit gewonnene Exsudatvolumen gemessen. Die Lagerung der Proben erfolgte jeweils bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

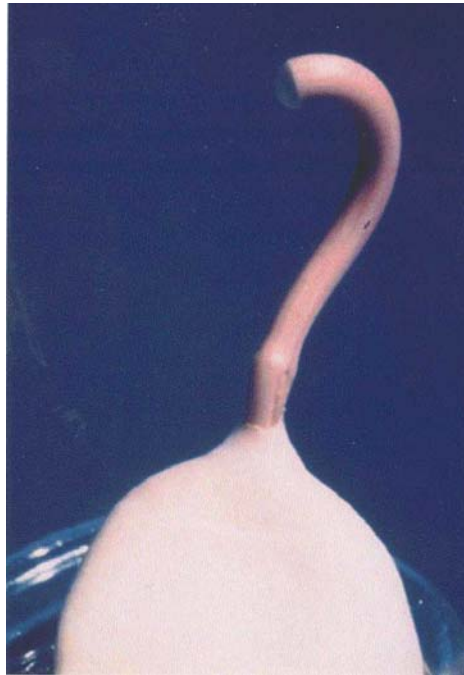


Abb. 2.2 Gewinnung von Siebröhrenexsudat nach Anschneiden des Hypokotyls.

2.4.2 Wurzeldruckexsudat

Zur Gewinnung von Wurzeldruckexsudat wurde das Hypokotyl vom Haken ausgehend in Richtung der Verdickungszone keilförmig eingeschnitten. Anschließend öffnete man mittels eines waagrechten Schnittes die Leitbündel dieses Segments. Es wurde darauf geachtet, daß möglichst nur 3 der 8 Leitbündel angeschnitten waren. Um eine Verunreinigung des austretenden Wurzeldruckexsudats mit Siebröhrenexsudat zu verhindern, ließ man vor der Probenahme auf die Schnittstelle für 5 Minuten eine 1 M CaCl_2 -Lösung einwirken. Es ist bekannt, daß Calcium-Ionen die Kallosesynthese stimulieren und somit die Siebporen geschlossen werden (Kauss, 1987). Die Wurzeln waren während dieses Zeitraums in 0,5 mM CaCl_2 eingetaucht. Das austretende Wurzeldruckexsudat wurde mit graduierten Glaskapillaren gesammelt und das pro Zeiteinheit gewonnene Exsudatvolumen bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte jeweils bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.5 Ernte der Gewebeproben

Die verschiedenen Organe wurden nach den Exsudationsversuchen voneinander getrennt und nach Bestimmung des Frischgewichtes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff oder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.6 Analyse des Pflanzenmaterials

2.6.1 Bestimmung der Kohlenhydrate

2.6.1.1 Lösliche Zucker

Die Quantifizierung von Glukose und Fruktose in den Exsudaten und den Extrakten erfolgte mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests, bei dem die NADP^+ -Reduktion mit einem Eppendorf-Photometer (Typ 1101 M, Eppendorf, Hamburg) verfolgt wurde. Glukose wird dabei durch das Enzym Hexokinase (HK) unter Verbrauch von ATP zu Glukose-6-P phosphoryliert. Fruktose kann mit Hilfe von Hexokinase zu Fruktose-6-P umgewandelt werden. Das Enzym Phosphoglukoisomerase (PGI) setzt das gebildete Fruktose-6-P zu Glukose-6-P um. Glukose-6-P wird wiederum enzymatisch durch Glukose-6-P-Dehydrogenase (G6PDH) unter Bildung von NADPH/H^+ zu Glukonat-6-P oxidiert. Das dabei entstandene NADPH/H^+ kann bei 334 nm photometrisch bestimmt werden. Saccharose wird durch Invertase in die Hexosen Glukose und Fruktose gespalten, und die Hexosen werden enzymatisch in Glukose-6-P umgewandelt. Pro Mol Saccharose werden zwei Mol NADP^+ zu NADPH/H^+ reduziert.

Zur Extraktion der löslichen Zucker wurden die Gewebe nach Zugabe von 80 % (v/v) Ethanol und 20 % (v/v) 5 mM HEPES(KOH) pH 7,5 gemörsert. Nach einer Stunde Inkubation bei 70 °C wurde der Extrakt zentrifugiert. Die Exsudate wurden nach Verdünnung direkt für die Messung eingesetzt.

Der Testansatz zur Bestimmung der Hexosen Glukose und Fruktose bestand aus:

50 mM Tricin(NaOH) pH 8,0
5 mM MgCl₂
1 mM ATP
0,5 mM NADP⁺
0,7 U HK
0,35 U G6PDH

Die Messung der Saccharose erfolgte nach Vorinkubation in:

15 mM MES(KOH) pH 5,5
5 U Invertase
30 µl Probe

Das Reaktionsgemisch wurde für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Hydrolyse der Saccharose belassen.

2.6.1.2 Stärke

Die nach Quellung in Wasser über Nacht im Trockenschrank (100 °C) gewonnenen Stärkeaufschlüsse (Pellet aus der Extraktion der löslichen Zucker) hydrolisierte man durch Zugabe von Amyloglukosidase und β -Amylase für 2 Stunden bei 37 °C in Natriumacetat-Puffer pH 4,8. Aus dem Hydrolysat wurden die endständenen Glukoseeinheiten gemessen.

500 µl 100 mM Na-acetat-Puffer pH 4,8
5 µl β -Amylase
5 µl Amyloglukosidase
200 µl Probenextrakt
290 µl Aqua bidest.

2.6.2 Enzymatische ATP-Bestimmung

Auch die enzymatische ATP-Bestimmung basiert auf einem gekoppelten enzymatischen Test, bei dem die NADP^+ -Reduktion bei 334 nm bestimmt wurde. Nach 5minütiger Inkubation startete man die Messung durch Zugabe von 0,6 U Hexokinase zum Testansatz bestehend aus:

100 mM Tris(HCl) pH 8,1
5 mM MgCl_2
125 μM NADP^+
1 mM Glukose
0,3 U G6PDH
10 μl Probe

Die Messung erfolgte an einem Zweiwellenlängenfilterphotometer Sigma ZFP 22 der Firma Sigma Instrumente GmbH (Berlin).

Alternativ wurde die Nukleotidkonzentration mittels HPLC mit UV-Detektion (HPLC-Detektor 432, Kontron) bei 260 nm bestimmt. Als Laufmittel wurde 50 mM KH_2PO_4 (H_2SO_4) pH 3,4 mit einem Durchfluß von 0,8 ml min^{-1} verwendet, als Trennsäule diente eine Grom-Sil 120 Amino-2 PA, 5 μm , 250*4,6 mm (Grom, Herrenberg). Das empfangene Signal wurde mit dem Datensystem D 450 (Kontron) ausgewertet.

2.6.3 Bestimmung der stickstoffhaltigen Verbindungen

2.6.3.1 Freie Aminosäuren

Das frische Pflanzenmaterial wurde gemörsert und nach Zugabe von 80 % Aceton (v/v) weiter zerkleinert. Um die Proteine durch Fällung aus dem Extrakt zu entfernen, wurde es 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und danach zentrifugiert. Da Aceton die Messung stören würde, entfernte man dieses Lösungsmittel durch Einblasen von Preßluft aus dem Extrakt. Die Exsudate wurden nach Verdünnung direkt für die Messung eingesetzt.

Der wässrige Überstand der zentrifugierten Proben bzw. die Exsudate wurden für die Aminosäurebestimmung mit der HPLC-Methode nach Schurr und Gebauer (1989) verwendet. Dieser Nachweis der freien Aminosäuren beruht auf der Bildung von fluoreszierenden Derivaten durch Umsetzung der primären Aminogruppen mit *o*-Phthalsäuredialdehyd (OPA). Die Messung erfolgte mittels eines Fluorometers SFM 25 (Kontron, Eching). Die Auslösung der Derivatbildung erfolgte durch einen automatischen Probengeber (Autosampler 460, Kontron), der in 40 μl Probe jeweils 80 μl Derivatisierungsreagenz injizierte. Nach 2minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 40 μl der derivatisierten Probe auf eine Trennsäule (Sperisorb ODS II, 5 μm , 250*4,6 mm, Muder & Wochele, Berlin) aufgetragen, die im Fluorometer ankommenden Fluoreszenzsignale mit einem digitalen Datensystem (D450, Kontron) erfaßt und mit einem Aminosäurenstandard bekannter Konzentration geeicht.

Bedingungen der Aminosäurenanalyse:

Derivatisierung:

Zur Derivatisierung wurde ein Gemisch aus Reagenz A und B im Verhältnis 50:3 verwendet.

A: 99 g Borsäure, 52 g KOH in 1 l H₂O pH 10,5 + 2 ml Brij35 (Polyethylenglycoldodecylether)

B: 800 mg *o*-Phthalsäuredialdehyd in 10 ml Ethanol + 2 ml Mercaptoethanol

Trennbedingungen:

Die Flußrate betrug 1 ml min⁻¹, zusammengesetzt aus veränderlichen Anteilen von Laufmittel A und B. Der Gradient gibt jeweils den Anteil von B an.

A: 50 mM Na-acetat (H₃PO₄) pH 6,8, 1,5 % Tetrahydrofuran (THF)

B: 97 % Methanol, 3 % THF

Gradient:

0 - 12 min:	von 0 auf 15 % B (linear)
12 - 65 min:	von 15 auf 50 % B (linear)
65 - 67 min:	100 % B
67 - 69 min:	von 100 % auf 10 % B (linear)
69 - 70 min:	10 % B

Nachweisbedingungen:

Excitationswellenlänge: 340 nm

Emissionswellenlänge: 455 nm

2.6.3.2 Nitrat

Schockgefrorenes und anschließend getrocknetes Pflanzenmaterial wurde gemörsert und nach Zugabe von bidestilliertem Wasser weiter zerkleinert. Darauffolgend inkubierte man den Extrakt 10 min lang bei 95°C und zentrifugierte. Ein Aliquot des Überstands wurde zur Messung herangezogen. Die Exsudate setzte man nach Verdünnung direkt in die Messung ein. Bestimmt wurde die Nitratkonzentration mittels Anionenaustausch-HPLC nach Thayer und Huffaken (1980) mit UV-Detektion (HPLC-Detektor 432, Kontron) bei 210 nm. Als Laufmittel diente 45 mM KH₂PO₄ (H₂SO₄) pH 2,7 bei einer Durchflußrate von 2 ml min⁻¹. Die Trennphase basierte auf Kieselgel (Grom-Sil 120 ODS-5 ST, 5µm; Grom, Herrenberg). Das empfangene Signal wurde mit dem Datensystem D450 (Kontron) ausgewertet.

2.6.4 Messung von Kohlenstoff und Stickstoff

Kohlenstoff- und Stickstoffgesamtwerte wurden mit Hilfe eines C/N-Analysators (ANA 1500, Carlo Erba instrumentazioni, Italien) gemessen. Der Analyse liegt eine Verbrennung in reinem Sauerstoff zugrunde. Dazu wurden 2 bis 4 mg des getrockneten bzw. 2 bis 5 µl des gefriergetrockneten Materials in Zinnhütchen (Lydi, Schweiz) eingewogen. Als Standard wurde Atropin (4,84 % N; 70,56 % C) verwendet. Die Detektion der ¹⁵N-Signale erfolgte mit einem Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT Delta D (Bremen).

2.6.5 Bestimmung von Kalium, Phosphor, Schwefel und Natrium

Nach der Methode von Schramel *et al.* (1980) wurden Gewebeteile unter Druck naß verascht. Dazu wurden 0,1 bis 0,3 g frisches Pflanzenmaterial in die speziell für die Apparatur gefertigten Quarzaufschlußgläser eingewogen und mit 1 ml 65 % HNO₃ versetzt. Anschließend wurden die Gläser im Teflongefäß verschlossen und bei 170 °C sechs bis zehn Stunden bei 100 bis 120 kPa in einer Druckaufschlußapparatur (Aufschlußtechnik Seif, Unterschleißheim) aufgeschossen. Die Quantifizierung in der Druckaufschlußlösung erfolgte mit Hilfe eines Atomemissionsspektrometers mit induktiv gekoppelten Plasma-MS (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) der Firma GBC Integra (Australien) am Bayreuther Institut für Terrestrische Ökosystemforschung (BITÖK). Der Nachweis der Elemente im Siebröhren- und Wurzeldruckexsudat erfolgte mittels Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS, Perkin Elmer 5000, Perkin Elmer, USA) oder mittels Atomemissionsspektrometrie (s.o.).

2.6.6 Quantifizierung des freien Phosphats

Das frische Pflanzenmaterial wurden gemörsert, mit bidestilliertem Wasser versetzt und 10 min lang bei 95°C extrahiert. Danach wurde der Rohextrakt zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstands wurde zur Bestimmung des wasserextrahierbaren Phosphatanteils herangezogen. Die Exsudate wurden nach Verdünnung direkt in die Messung eingesetzt. Der Phosphat-Nachweis erfolgte nach der Methode von Ames (1966) photometrisch, wobei das Phosphat mit Molybdat einen Komplex bildet und dieser anschließend durch Ascorbinsäure reduziert wird. Die Extinktion des reduzierten Komplexes wurde bei 820 nm ermittelt. Die Messung erfolgte an einem Spektralphotometer der Marke LKB Biochrom Ultraspec II (Pharmacia Biosystems, Freiburg).

2.6.7 Quantifizierung des freien Sulfats

Wie bei der Phosphat-Bestimmung wurde das frische Pflanzenmaterial gemörsert, mit bidestilliertem Wasser versetzt und 10 min lang bei 95°C extrahiert. Danach wurde der Rohextrakt zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstands wurde zur Messung des wasserextrahierbaren Sulfats herangezogen. Die Exsudate wurden nach Verdünnung direkt in die Bestimmung eingesetzt. Ermittelt wurde die Sulfatkonzentration mittels Anionenaustausch-HPLC mit Leitfähigkeits-Detektion (Ion-Analyzer, Wescan, USA). Als Laufmittel diente 4 mM Phthalsäure(Kaliumphthalat) pH 2,7 mit einem Durchfluß von 3,4 ml min⁻¹ verwendet. Die Trennphase basierte auf Kieselgel (Trennsäule Typ 302.J.C., Vydac, USA). Das empfangene Signal wurde mit dem Datensystem D 450 (Kontron) ausgewertet.

2.7 Aufnahme- und Effluxmessungen

2.7.1 Bestimmung der unidirektionalen Stoffaufnahme in die Keimblätter

Die Inkubation zur Etablierung der *steady state*-Bedingungen erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Nachdem die *steady state*-Situation erreicht war, startete man die Messung der unidirektionalen Aufnahme in den Symplasten der Keimblätter durch Zugabe der jeweiligen markierten Substanz. Dazu wurde in definierten Zeiträumen zur Erstellung einer Kinetik eine Pflanze entnommen und dreimal zwei Minuten in frischem unmarkiertem Inkubationsmedium gewaschen. Danach tupfte man die Pflanze auf saugfähigem Papier ab, zerkleinerte das Pflanzenmaterial und kochte es nach Zugabe von bidestilliertem Wasser 15 min lang bei 95°C. Zur Zählung versetzte man die Probe mit Lumasafe Plus (Luma-LSC, Groningen) oder Rotiszint (Roth, Karlsruhe). Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationszähler der Firma Packard 2500 TR (Camberra-Packard, Dreieich). Eine Unterteilung in lösliche und unlösliche Fraktion erbrachte keine höhere Ausbeute, deshalb wurde darauf verzichtet.

Die radioaktiven Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

¹⁴C-Glutamin: Amersham Pharmacia, Braunschweig

³³P-Phosphat: Nen Life Science, Köln

³⁵S-Sulfat: Nen Life Science, Köln

Für die Elemente ⁴¹Kalium, ²⁵Magnesium und ⁴⁴Calcium wurde das Inkubationsmedium zur Ermittlung der Aufnahmerate herangezogen. Verfolgt wurde die Isotopenverteilung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Gesamtkonzentration des jeweiligen Elements. Auch das Volumen des Inkubationsmediums und das Volumen der Keimblätter bzw. die Konzentration in den Keimblättern floß in die Berechnung ein. Das stabile Isotop von Kalium wurde freundlicherweise von W. Schröder und A. Kuhn (FA Jülich) zur Verfügung gestellt und analysiert. Die Bestimmung erfolgte mittels LAMMA (laser microprobe mass analyser; Kuhn *et al.*, 1995) und SIMS (secondary ion mass spectrometry).

2.7.2 Bestimmung der unidirektionalen Effluxrate aus den Keimblättern

Die symplastische Effluxrate bestimmte man durch eine im Vergleich zur Aufnahmemessung umgekehrte Markierungsfolge. Die Inkubation mit markierter Substanz zur Etablierung der *steady state*-Bedingungen erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Nachdem die *steady state*-Situation erreicht war, wurde die Messung der unidirektionalen Effluxrate aus den Keimblättern durch Überführung in die jeweilige nichtmarkierte Substanz gestartet. Im Abstand von 3 bis 5 Minuten wurden jeweils 100 µl des Inkubationsmediums entnommen und in die Zählung eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug längstens 45 min. Man entnahm maximal drei Proben pro Ansatz. Zur Ermittlung der Radioaktivität wurden die Medien mit Lumasafe Plus oder Rotiszint

versetzt und in einem Szintillationszähler gezählt. Die Bestimmung der Kalium-Effluxrate erfolgte mittels LAMMA und SIMS in der FA Jülich. In die Berechnung floß das jeweilige Isotopenverhältnis und die bei diesen Bedingungen erzielte Aufnahme ein.

2.7.3 ¹⁵N-Nitrat-Aufnahme durch die Wurzel

Die Wurzel intakter Keimlinge wurden bis zum Erreichen einer neuen *steady state*-Bedingungen in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und 1 mM, 3 mM oder 10 mM Kaliumnitrat inkubiert. Nach dieser Vorinkubation erfolgte ein *pulse* mit ¹⁵N-markierter Kaliumnitrat, das freundlicherweise von G. Gebauer (Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt wurde. Die Blätter tauchten während des gesamten Versuchszeitraums in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Die Ernte der Keimblätter erfolgte nach weiteren 2 min und 4 min in unmarkierter Lösung (*chase*). Die Analyse der Proben erfolgte am BITÖK (siehe Abschnitt 2.6.3).

2.7.4 Phosphat- und Sulfatefflux aus der Wurzel

Zur Bestimmung des Substrateffluxes über die Wurzel wurden die Keimblätter intakter Keimlinge bis zum Erreichen der *steady state*-Bedingungen in markierter Lösung vorinkubiert. Die Wurzel tauchte während dieser Zeit in unmarkiertes Medium ein (Zusammensetzung vgl. Abschnitt 2.3.1). Danach überführte man die Wurzel in neues unmarkiertes Medium (20 ml), an den Keimblättern wurde weiterhin markiertes Substrat angeboten. In den nächsten 6 Stunden entnahm man in definierten Zeitabständen jeweils 200 µl des Wurzelmediums. Zur Zählung versetzte man die Probe mit Lumasafe Plus oder Rotiszint. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationszähler (Abschnitt 2.7.1). Es wurde davon ausgegangen, daß es sich bei der aus der Wurzel austretenden Markierung um die an den Keimblättern angebotene markierte Substanz handelt.

2.8 Lokalisierung verschiedener Elemente in den Keimblättern

Um Aufschlüsse über den Stofftransport durch die Keimblätter zu erhalten, wurde die zelluläre, extrazelluläre und subzelluläre Verteilung der Elemente Kalium, Phosphor, Magnesium, Calcium und Schwefel in den vom Endosperm umgebenen Keimblättern untersucht.

Das in kleine Abschnitte geschnittene Pflanzenmaterial wurde in Isopentan schockgefroren und mit flüssigem N₂ oder Propan/Isopentan gekühlt (Rick *et al.*, 1982). Danach wurde das Gewebe bei 228 K 48 h lang gefrieretrocknet und über 16 h hinweg auf 293 K aufgetaut. Die Infiltration mit Ether erfolgte nach der bei Fritz (1980) beschriebenen Methode der *vacuum-pressure-infiltration*. Für die Einbettung in *Kunststoff* wählte man Styrol-Methylacrylat (Mohr und Cocking, 1968). Die Mischung setzte sich zusammen aus: 50 ml Styrol, 50 ml Butylmethylacrylat (Merck, Darmstadt) und 0,5-0,75 g Benzylperoxid, das mit 50 % Phthalat

(Petrochemie, Höllriegelskreuth) stabilisiert wurde. Die Polymerisation fand bei 333 K (7 Tage) oder 313 K (10-12 Tage) statt.

Die Einbettung erfolgte nach folgendem Schema:

Ether/Kunststoff	1:1	3 h
Ether/Kunststoff	1:3	3 h
Kunststoff		24 h + 24 h

Die Analyse erfolgte in einem Philips EM 420 mit einem EDXA-System 9100. Der Durchmesser der untersuchten Fläche betrug 1 mm (intrazellulär) oder 250 nm im Zellwandraum (Fritz, 1989). Zur Quantifizierung des Elementvorkommens dienten *Agar-Standards*. 5 % Agar (Difco Bacto-Agar, Difco-Laboratories, Detroit) wurde in bidest. Wasser bei Raumtemperatur suspendiert. Um ionische Verunreinigungen zu entfernen, wechselte man das Wasser mehrmals. Danach wurde die Agar-Suspension erwärmt und zum Lösen der Salze benutzt. Mit den so gewonnenen Agarblöcken wurde im Weiteren, wie oben beschrieben, verfahren. Durch Messung des *peak-continuum-Verhältnisses* konnte die im Meßbereich auftretende Elementkonzentration quantifiziert werden (Fritz und Jentschke, 1994).

3 *Ergebnisse*

Die stoffliche Zusammensetzung der Apoplastenlösung ist keine unabhängige Größe. Sie ist Ausgangs- und Endpunkt mehrerer, in gegensätzliche Richtungen verlaufender Flüsse. Dabei handelt es sich um die Aufnahme und die Abgabe aus Parenchymzellen, die Beladung und die Entladung des Phloems und die Wasser- und die Stoffflüsse im Apoplasten einschließlich des Xylems. Diese Vorgänge stehen in enger Wechselwirkung zueinander, wobei sich der Blattapoplast im Mittelpunkt dieser Flüsse befindet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es diese Nährstoffflüsse zwischen Blattapoplast, Blattgewebe, Phloem und Xylem zu messen und zu bilanzieren. Von Interesse waren die Substrate Kohlenstoff in Form von Saccharose, Stickstoff (Glutamin), Kalium-Ionen, Phosphat und Sulfat. Als Versuchsobjekt diente der sechs Tage alte Ricinuskeimling.

3.1 Methodischer Ansatz

Wird der Keimling auf nährstofffreiem Medium (Ausnahme: CaCl_2 ; Abschnitt 2.2.1; Zhong *et al.*, 1998) angezogen, ist er ausschließlich auf die vom Endosperm bereitgestellten Substrate angewiesen. Nach Mobilisierung aus diesem Nährgewebe erreichen alle Stoffe auf apoplastischem Wege die Keimblätter. Das Endosperm läßt sich leicht abpräparieren. Somit kann die stoffliche Zusammensetzung der Apoplastenlösung manipuliert werden. Diese Eigenschaften wurde zur Quantifizierung der Wechselwirkungen einer definierten apoplastischen Konzentration mit den Konzentrationen bzw. den Flüssen innerhalb des Phloems und Xylems ausgenutzt (siehe Abschnitt 1.7). Dazu muß sich das System im Zustand eines Fließgleichgewichtes befinden. Da keinerlei Kenntnisse über die Nährstoffsituation unter *steady state*-Bedingungen vorlagen, wurde in den einzelnen Abschnitten detailliert auf die Etablierung dieses Gleichgewichtes eingegangen. Erst danach ließ sich die unidirektionale Aufnahme in die Keimblätter und die unidirektionale Effluxrate aus den Zellen der Keimblätter bestimmen.

3.1.1 Abschätzung der *in vivo*-Situation im apoplastischen Raum

Die Substratkonzentrationen in der künstlichen Apoplastenlösung (externe Bedingungen) wurden so gewählt, daß sie um die vermeintliche *in vivo*-Konzentration im apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm kreisen (Tab. 3.1.1; Zhong, 1994). Zur Abschätzung der natürlichen Situation wurde die Konzentration des jeweiligen Substrates im Siebröhrenexsudat nach Inkubation in nährstofffreiem Medium, bei Keimlingen mit Endosperm und nach Substratzugabe verglichen.

Für Kalium ging man von einer freien Konzentration von 1 mM aus, bei Sulfat von annähernd 5 mM. Ein interessantes Verhalten zeigte Phosphat. Die Konzentration im Siebröhrenexsudats der inkubierten Keimlinge übertraf in allen Fällen diejenige der Ausgangsbedingung. Es wurde im Folgenden von 2 mM externem Phosphat ausgegangen. Für Saccharose erwartete man anhand der Analyse des *Endospermhäutchens* eine *in vivo*-Konzentration von 70-90 mM (Komor, 1977). Basierend auf Versuchen von Orlich (1998) wurden 100 mM Saccharose eingesetzt, zum Vergleich dienten 10 und 300 mM (siehe Abschnitt 3.2). Bei Glutamin ging man von einer apoplastischen Konzentration zwischen 3 und 10 mM aus (Schobert und Komor, 1989; Komor, persönliche Mitteilung).

Tab. 3.1.1 Abschätzung der freien Substratkonzentration im apoplastischen Raum zwischen dem Endosperm und der Unterseite der Keimblätter sechs Tage alter Ricinuskeimlinge. Es wurde die Konzentration im Siebröhrenexsudat von Keimlingen mit Endosperm und inkubierten Keimlingen (3h Vorinkubation, 1h Dauerexsudation) verglichen. Die Konzentration der eingesetzten Substrate betrug 10 mM (Puffer: 5 mM MES(KOH bzw. NaOH) pH 5,5) (n=4).

externe Bedingungen	Konzentrationen im Siebröhrenexsudat [mM]		
	Kalium-Ionen	Phosphat [°]	Sulfat [°]
Puffer	35,50 ± 9,01	9,56 ± 1,24	1,00 ± 0,37
mit Endosperm	44,40 ± 7,25	7,30 ± 1,19	1,90 ± 0,30
10 mM Substrat (nach Zhong, 1994)	60	15	7

*unter Berücksichtigung des negativen Effekts einer erhöhten Konzentration auf den Volumenfluß (Kallarackal *et al.*, 1989)

[°]unter Berücksichtigung, daß ca. 50 % P bzw. S in organischer Form transportiert werden (Komor *et al.*, 1996)

3.1.2 Konzentrationen und Volumenflußraten im Phloem

Bislang wurde v.a. das Siebröhrenexsudat von Keimlingen nach Dauerexsudation untersucht. Dabei konnte Zhong (1994) zeigen, daß es dabei zu einer zeitabhängigen Veränderung des Volumenflusses und der Substratkonzentration im Phloem kommen kann. Dieser Effekt trat in Abhängigkeit vom Stoffangebot z.T. schon nach 1 bis 2 Stunden auf. Für Glutamin konnte dies spätestens nach einstündiger Exsudation gezeigt werden (Schobert und Komor, 1989). Desweiteren war bekannt, daß Kalium-Ionen einen negativen Effekt auf den Volumenfluß im Phloem haben (Kallarackal *et al.*, 1989). Die Zeitabhängigkeit der Phosphat- und Sulfatkonzentration im Siebröhrenexsudat ist in Tab. 3.1.2 dargestellt.

Tab. 3.1.2 Phosphat- und Sulfatkonzentration im Siebröhrenexsudat bei sechs Tage alten Ricinuskeimlingen, die mit dem Endosperm exsudierten. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=6).

Exsudationszeit [min]	Konzentrationen im Siebröhrenexsudat [mM]		Volumenfluß [µl x h ⁻¹ x Keimling ⁻¹]
	Phosphat	Sulfat	
20	7,23 ± 2,91	1,78 ± 0,31	32,70 ± 7,20
60	7,93 ± 3,02	1,41 ± 0,38	26,40 ± 8,00
80	9,32 ± 1,07	2,07 ± 0,36	20,30 ± 7,40
120	11,05 ± 1,83	3,14 ± 0,53	16,20 ± 3,90

3.1.3 Zirkulation zwischen Phloem und Xylem

Stoffzirkulation in Pflanzen ist schwer nachweisbar. Dafür ist eine gleichzeitige Messung des Massenflusses im Xylem und Phloem an einer definierten Stelle der Pflanze notwendig. Eine zuverlässige Messung der Flußgeschwindigkeiten im Xylem und im Phloem, die für die Berechnung der Massenflußraten benötigt wird, ist bislang nur begrenzt möglich. Eine Lösung für dieses Problem liefern *nicht-invasive* NMR-Messungen (Köckenberger *et al.*, 1997) oder auch Systeme, die positronen-emittierende Tracer abbilden (Hayashi *et al.*, 1997). Nicht-invasive ¹H-NMR-Messungen an Ricinuskeimlingen zur Quantifizierung der Wasserflüsse lagen vor (Köckenberger *et al.*, 1997; Phloem: 17 µl x h⁻¹ x Keimling⁻¹ und Xylem: 35 µl x h⁻¹ x Keimling⁻¹). Sie sind den *in vivo*-Flußraten gleichzusetzen, da hierfür am Keimling nicht manipuliert werden mußte. Durch Exsudation gewonnene Volumenflußraten konnten nun mit den *in vivo*-NMR-Messungen verglichen werden.

3.1.3.1 Volumenflußraten im Xylem

Besonders wichtig war die Betrachtung der Xylemflüsse. Die in Abschnitt 2.4.2 beschriebene Methode zur Gewinnung von Wurzeldruckexsudat wurde für die Quantifizierung einer potentiellen Nährstoffzirkulation neu entwickelt. Üblicherweise ging man so vor, daß man alle Xylemgefäße an der Basis der Hypokotyls vollständig durchtrennte. Es werden alle 8 Leitbündel geöffnet, nach keilförmige Einschnitten lag die Anzahl der offenen Leitbündel zwischen 3 und 4. D.h. mindestens 4 der Phloemstränge blieben intakt. Die Probenahme erfolgte jeweils im apikalen Bereich knapp oberhalb des Hypokotylhakens.

Tab. 3.1.3 Abhängigkeit der Volumenflußrate des Xylems von der Methode, dem Ort der Exsudatgewinnung und dem Substratangebot an den Keimblättern bei sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen. Die Inkubationszeit vor der Exsudatnahme betrug 6 Stunden. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (Inkubationsbedingungen siehe Abschnitt 2.3.1) (n=5).

Volumenflußraten des Xylems [$\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
basales Hypokotyl (ganz durchgetrennt)	
mit Endosperm	$8,1 \pm 1,2$
+ 100 mM Saccharose	$27,4 \pm 10,1$
+ 10 mM Glutamin	$23,5 \pm 5,6$
apikales Hypokotyl (ganz durchgetrennt)	
mit Endosperm	$46,4 \pm 5,6$
+ 2 mM Phosphat	$48,7 \pm 8,4$
+ 10 mM Glutamin	$47,4 \pm 5,7$
apikales Hypokotyl (keilförmig eingeschnitten)	
mit Endosperm*	$45,9 \pm 6,3$

* siehe Abschnitt 3.2 bis 3.5

In Tab. 3.1.3 ist gezeigt, daß es erhebliche Diskrepanzen zwischen den Volumenflußraten ermittelt am basalen Hypokotyl, knapp oberhalb der Wurzel, und den Flüssen im apikalen Hypokotyl, nahe der Verdickungszone, gab. Im basalen Hypokotyl bestanden zusätzlich noch Unterschiede zwischen den mit Endosperm exsudierenden Keimlingen und den inkubierten Keimlingen. Die für das apikale Hypokotyl beschriebenen Raten unterschieden sich nicht. Als bevorzugter Ort für die Gewinnung der Wurzeldruckexsudate wurde das apikale Hypokotyl gewählt. Nur durch die gleichen Ort der Probenahme ist die exakte Messung der Massenflußraten im Xylem und im Phloem zur Quantifizierung der Stoffzirkulation möglich. Auf die Besonderheit des keilförmigen Einschnittes geht der nächsten Abschnitt ein.

3.1.3.2 Verunreinigungen im Wurzeldruckexsudat

Orlich (1998) verwendete die ATP-Konzentration des Siebröhrenexsudats als Marker für die *Gesundheit* der Keimlinge. Wie bei Keimlingen mit Endosperm fand man auch bei den saccharose-inkubierten Keimlingen bis zu 1,5 mM ATP im Exsudat. Der Stoffwechsel in den Keimlingen scheint durch die Inkubation nicht wesentlich gestört worden zu sein. Die ATP kann aber nicht nur als Marker für die Vitalität der Keimlinge verwendet werden, es kann auch zum Nachweis von Verunreinigungen im Wurzeldruckexsudat dienen. Die Möglichkeit der Kontamination mit Siebröhreninhalt muß berücksichtigt werden, da es bei *Ricinus communis* L. nach Öffnen nicht zum Verschluß der Siebröhren kommt. Die ATP-Konzentration wurde als Marker gewählt, da ATP im Siebröhrenexsudat, aber nicht im Xylemsaft (Wurzeldruckexsudat) vorkommt (Hall und Baker, 1972). Im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Keimlingen mit Endosperm (n=10) wurden zwischen 0,90 und 1,5 mM ATP gefunden, im Wurzeldruckexsudat (n=10) 5 bis 10 μM ATP. Das gesammelte Wurzeldruckexsudat enthielt ca. 1 % Siebröhrenexsudat. In den nach vollständigem Durchtrennen des Hypokotyl gewonnenen

Wurzeldruckexsudat fand man bis zu 120 μM ATP, es war somit in erheblichem stärkeren Maße verunreinigt.

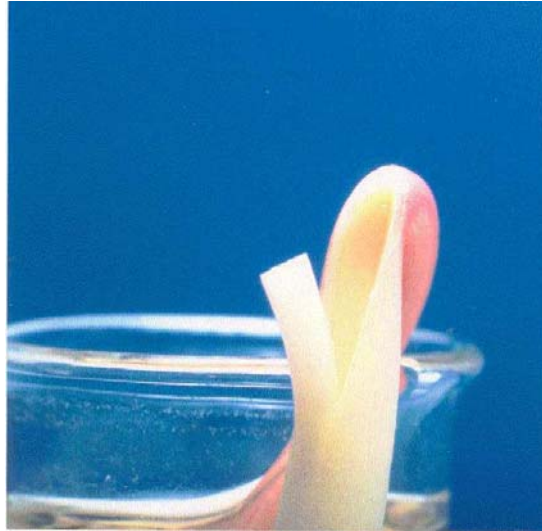


Abb. 3.1.1 Gewinnung von Wurzeldruckexsudat nach Anschneiden des Hypokotyls.

3.2 Ferntransport von kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Substraten

Das Endosperm ist reich an Proteinen. Diese werden nach Spaltung in ihre Aminosäuren in den apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm abgegeben und von dort in die Keimblätter aufgenommen (Robinson und Beevers, 1981a,b). Es bestehen zwischen den verschiedenen Aminosäuren Unterschiede in der Effizienz der Aufnahme in die Keimblätter und der Phloembeladung (Schobert und Komor, 1989). Im Phloem überwiegen die freien Aminosäuren alle anderen stickstoffhaltigen Verbindungen. Bei allen Pflanzen, bei denen bislang die Zusammensetzung des Siebröhreninhalts analysiert werden konnte, wurden Glutamin und/oder Asparagin als dominante Stickstofftransportformen gefunden (Weibull *et al.*, 1990; Winter *et al.*, 1992; Lohaus *et al.*, 1998). Im Siebröhrenexsudat von Ricinuskeimlingen mit Endosperm findet man ca. 100 mM Aminosäuren, wobei das zwei N-tragende Glutamin mit einem Anteil von ca. 50 % dazu beiträgt (Schobert und Komor, 1989).

3.2.1 Glutamintransport nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten

Um Informationen über den Glutamintransport im Keimling zu erhalten, wurden die neuen *steady state*-Bedingungen für unterschiedliche apoplastische Konzentrationen (in den Keimblättern, in den Siebröhren und im Xylem) etabliert. Unter natürlichen Bedingungen scheint die Konzentration im apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm einen Wert zwischen 3 mM (Schobert und Komor, 1989) und 10 mM (Komor, persönliche Mitteilung) zu erreichen. Aus diesem Grund wurde der künstlichen Apoplastenlösung zunächst 10 mM Glutamin zugegeben. Als Vergleich dienten 3 mM und 50 mM Glutamin. Desweiteren wurde die Glutaminaufnahme in die Keimblätter und der Efflux aus den Parenchymzellen in Abhängigkeit vom externen Angebot bestimmt.

3.2.1.1 Konzentration in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat

Die Glutaminkonzentration in den vom Endosperm umgebenen Keimblättern betrug $146,2 \pm 18$ mM, im Siebröhrenexsudat $44,3 \pm 5$ mM. Wurde der Keimblattapoplast an intakten Keimlingen in 3 mM bzw. 10 mM Glutamin equilibriert (Abb. 3.2.1), reduzierte sich die Konzentration in den Keimblättern im Laufe der ersten 6 Stunden deutlich. Während sie sich bei der niedrigen apoplastischen Konzentration auf diesem geringen Niveau einpendelte, stieg sie bei 10 mM externem Glutamin erneut an. Nach 8 Stunden war die *in vivo*-Konzentration wieder erreicht. Dies diente als Hinweis dafür, daß die Glutaminkonzentration im apoplastischen Raum zwischen Endosperm und Keimblättern annähernd 10 mM beträgt. Nach Transfer in 50 mM Glutamin verdoppelte sich die Glutaminkonzentration der Keimblätter schon nach kurzer Zeit. Der Einfluß des externen Glutamins auf das Siebröhrenexsudat war bei 3 mM gering. 10 mM Glutamin ließen die Glutaminkonzentration im Exsudat leicht, 50 mM Glutamin sogar drastisch ansteigen (Abb. 3.2.1).

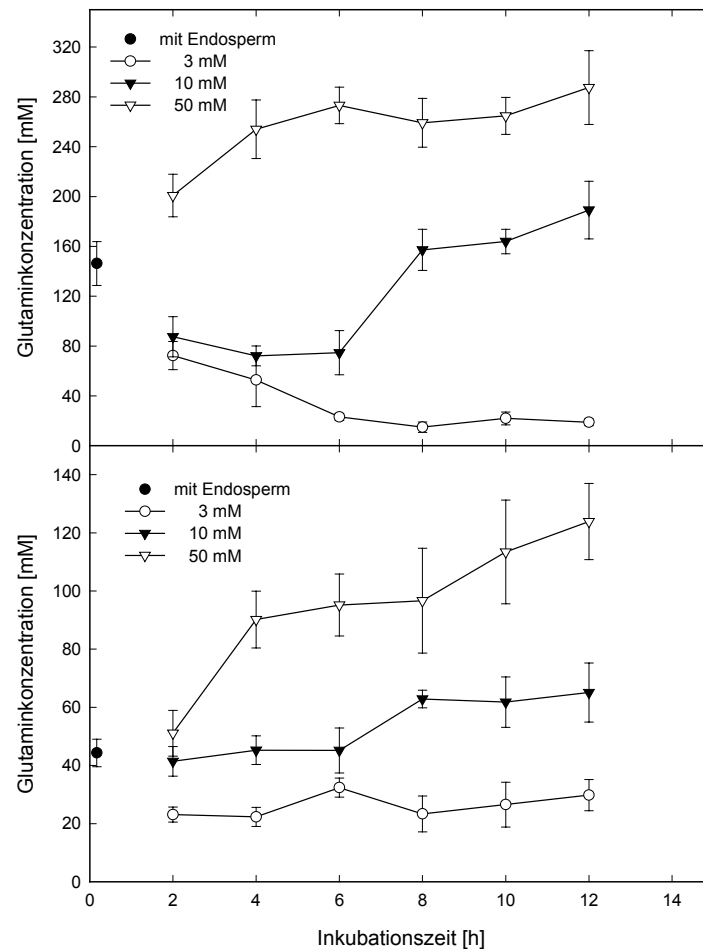


Abb. 3.2.1 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Glutamin in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Glutamin in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 15 min. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Glutamingehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % berechnet. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n \geq 3$).

3.2.1.2 Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem

Überall dort wo der Apoplast als Kompartiment am Transport beteiligt ist, kann durch die Aufnahmeaktivität in die Zellen die Verteilung der Stoffe in den Geweben reguliert werden. Im folgenden Abschnitt wird auf die transmembranen Konzentrationsgradienten (Abb. 3.2.2) und die Akkumulationsfaktoren in Abhängigkeit von der apoplastischen Konzentration (Tab. 3.2.1) eingegangen.

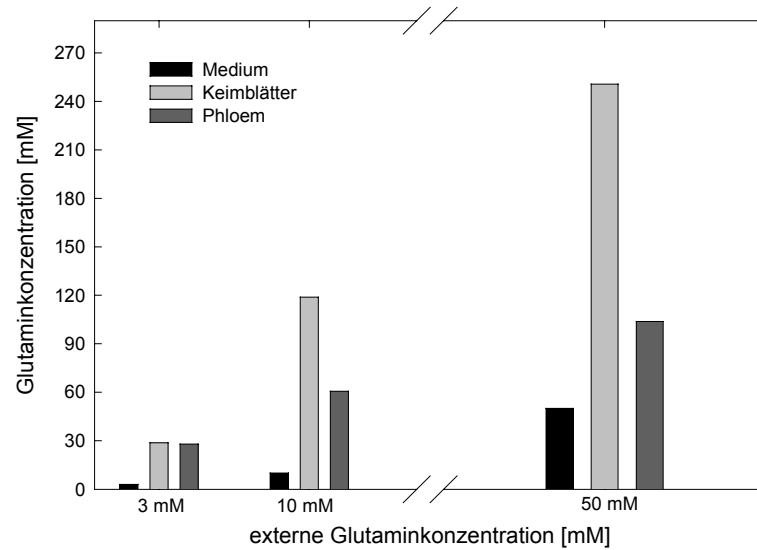


Abb. 3.2.2 Vergleich der *steady state*-Konzentrationen im Medium (künstliche Apoplastenlösung), in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter in 3 mM, 10 mM und 50 mM Glutamin. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Glutamingehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

Verfolgt man den Weg des Glutamins vom apoplastischen Raum zwischen dem Endosperm und den Keimblättern, in die Keimblätter und auf dem weiteren Wege ins Phloem, kann man feststellen, daß es zu einer Anreicherung von Glutamin zwischen den Keimblättern und dem Medium (künstliche Apoplastenlösung) aber auch zwischen dem Phloem und dem Medium kam. Die intrazelluläre Konzentration der Keimblätter übertraf in allen drei Fällen die apoplastische Konzentration deutlich. Der Anreicherungsfaktor zwischen den Keimblättern und dem Apoplast (Medium) fiel jedoch von 10 bzw. 12 auf ungefähr 5. Auch der Unterschied zwischen Phloem und Medium verringerte sich mit steigendem Angebot von 9 auf 2.

Tab. 3.2.1 Akkumulationsfaktoren unter *steady state*-Bedingungen für Glutamin zwischen dem Medium (künstliche Apoplastenlösung), den Keimblättern und dem Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlingen, die in 3 mM, 10 mM oder 50 mM Glutamin. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Glutamingehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

externe Bedingungen	<u>Keimblätter</u>	<u>Siebröhrenexsudat</u>
	Medium	Medium
3 mM Glutamin	10	9
10 mM Glutamin	12	6
50 mM Glutamin	5	2

3.2.1.3 Glutamin-Massenflußraten in Phloem und Xylem

Durch die Kenntnis der Stoffkonzentration im Exsudat und durch die Quantifizierung des pro Zeiteinheit austretenden Exsudatvolumens, war es möglich die Massenflußraten in der jeweiligen Leitbahn zu bestimmen. Diese stellen ein Produkt aus der Konzentration eines Stoffes und der Volumenflußrate dar. Aus diesem Grund ging man zunächst auf die Abhängigkeit der Glutaminkonzentration im Wurzeldruckexsudat von der apoplastischen Konzentration an den Keimblättern eingegangen, errechnete die Massenflußraten und verglich sie mit denen des Phloems. So konnte die Frage beantwortet werden, ob Glutamin in Abhängigkeit vom apoplastischen Angebot im Ricinuskeimling zirkuliert.

Während 3 mM externes Glutamin die Glutaminkonzentration des Wurzeldruckexsudat im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm reduzierte, stieg sie bei den beiden anderen apoplastischen Konzentrationen an. 50 mM externes Glutamin führten sogar annähernd zu einer Verdreifachung (Abb. 3.2.3). Die Volumenflußrate des Phloems schwankte zwischen 13 und 17 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ (3 mM und 10 mM) und 15-18 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ (50 mM). Der Volumenfluß im Xylem lag zwischen 36 und 52 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Die Volumenflußraten zeigten somit keine Abhängigkeit von der externen Glutaminkonzentration. Die Differenzen in den Glutamin-Massenflußraten waren allein durch die unterschiedlichen Konzentrationen in der jeweiligen Leitbahn bedingt.

Insgesamt gesehen überstieg nach Transfer in 3 mM apoplastischem Glutamin überstieg der Phloemfluß denjenigen im Xylems. 10 mM und 50 mM Glutamin erbrachten eine Dominanz des Xylemtransports. Es wurde jedoch nur unwesentlich mehr Glutamin pro Zeiteinheit aus dem *sink* zurück in den *source* translokiert (Tab. 3.2.2).

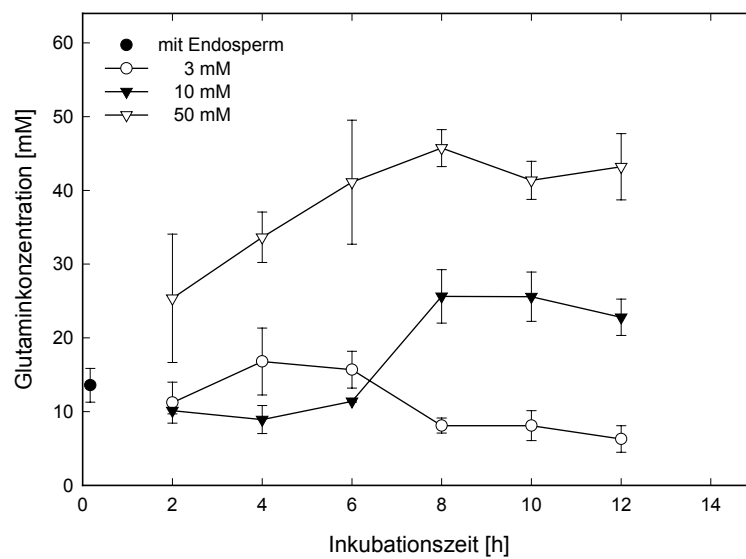


Abb. 3.2.3 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Glutamin im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Glutamin in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 15 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Tab. 3.2.2 *Steady state*-Massenflußraten von Glutamin im Phloem und Xylem sechs Tage alter Ricinuskeimlinge nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Glutamin in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben ($n=3 \times 3$).

externe Bedingungen	Glutamin-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Phloem	Xylem
3 mM Glutamin	$0,47 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,03$
10 mM Glutamin	$0,96 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,03$
50 mM Glutamin	$1,87 \pm 0,04$	$2,03 \pm 0,13$

Es kam in Abhängigkeit vom externen Glutaminangebot (3 mM, 10 mM und 50 mM) zur Etablierung einer neuen *steady state*-Situation in den Keimblättern, im Phloem und im Xylem. Sowohl die Keimblätter als auch das Phloem akkumulieren aktiv Glutamin entgegen eines Konzentrationsgradienten. Das exportierte Glutamin wird kaum (3 mM) oder nicht (10 und 50 mM apoplastisches Glutamin) im *sink* verbraucht, es rezirkuliert.

Schon Schobert und Komor (1989) untersuchten die Aminosäureverteilung in den einzelnen Geweben des Ricinuskeimlings. Sie verwendeten dazu sieben Tage alte Keimlinge. Beim Vergleich zeigen sich deutliche quantitative Unterschiede zu den sechs Tage alten Keimlingen (Tab. 3.2.4 und Tab. 2 Anhang). Das Aminosäuremuster ist jedoch vergleichbar. Die damalige Studie hatte das Ziel den für die Phloembeladung verantwortlichen Mechanismus zu charakterisieren. Glutamin z.B. wurde entlang des Transportweges vom Endosperm bis zum Phloem angereichert. Daraus schlossen Schobert und Komor (1989) auf eine apoplastische Beladung. Die nun erzielten Ergebnisse scheinen dem zu widersprechen, könnten auch dadurch hervorgerufen werden, daß die maximale Aufnahme der Aminosäuren weit vor dem Tag 7 erfolgt.

3.2.1.4 Glutaminaufnahme in die Keimblätter und symplastischer Efflux

Zur Quantifizierung der Glutaminflüsse aus dem apoplastischen Raum in die Keimblätter wurden intakte Keimlinge mit ihren Keimblättern in 3 mM, 10 mM und 50 mM Glutamin bis zur Etablierung der *steady state*-Situation vorinkubiert und dann in eine radioaktiv-markiertes Glutamin enthaltende Lösung gleicher Konzentration überführt. Nach definierten Zeitintervallen erntete man die Keimlinge und setzte sie zur Zählung der aufgenommenen Radioaktivität ein. Der lineare Bereich der Kinetik wurde ausgewertet. Durch umgekehrte Markierungsfolge bestimmte man den unidirektionalen Efflux aus den Keimblättern in die künstliche, glutaminhaltige Apoplastenlösung. Zuvor wurde die an der Außenseite der Keimblätter und die freizugängliche Markierung aus dem Apoplasten durch *Waschen* in gleichkonzentrierten Medien entfernt. Der lineare Bereich der Kinetik wurde ausgewertet (Abschnitt 2.7.1 und 2.7.2).

Tab. 3.2.3 Unidirektionale Glutaminaufnahme und unidirektionaler –efflux unter *steady state*-Bedingungen nach Inkubation der Keimblätter in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Glutamin in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n≥9).

externe Bedingungen	Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Aufnahme	Efflux
3 mM Glutamin	$0,98 \pm 0,13$	$0,07 \pm 0,03$
10 mM Glutamin	$3,05 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,18$
50 mM Glutamin	$4,90 \pm 1,43$	$0,69 \pm 0,09$

Zwischen 3 mM und 10 mM externem Glutamin erhöhte sich die Aufnahme in die Keimblätter proportional zur apoplastischen Konzentration. Ein Transfer in 50 mM Glutamin ließ hingegen die Aufnahmerate nicht mehr parallel zum Angebot ansteigen. Der Efflux betrug zunächst 10 % der Aufnahme. Etwas erhöht, mit ca. 15 % der Aufnahme, war er bei 50 mM externem Glutamin. Schon Robinson und Beevers (1981b) fanden, daß der Glutaminefflux aus den Keimblättern bei niedriger apoplastischer Konzentration bis zu 10 mM ungefähr 5–10 % der Aufnahme ausmacht. Die Metabolisierung im Symplasten erfolgt, wie sie zeigen konnten, sehr langsam. Der K_m -Wert beträgt 11 bis 12 mM, der V_{\max} zwischen 60–70 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{gFG})^{-1}$

(ungerechnet: $4\text{--}4,5 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimblattpaar}^{-1}$). Sie sprechen von einer Sättigung der Aufnahme bei über 20–30 mM apoplastischem Glutamin.

Die Glutaminaufnahme in die Keimblätter war konzentrationsabhängig und spätestens bei ca. 50 mM externem Glutamin gesättigt. Der Efflux aus dem Symplasten stieg nicht proportional mit der apoplastischen Konzentration und war zunächst gering. Bei der hohen apoplastischen Konzentration floß jedoch anteilig mehr Glutamin aus dem Symplasten in den Apoplasten.

3.2.2 Auswirkungen des externen Glutamins auf den Stickstoffhaushalt

Bisher wurde ausschließlich der Transport der Aminosäure Glutamin betrachtet, im Folgenden soll auch auf weitere freie Aminosäuren eingegangen werden. Da der Stickstoffmetabolismus und der –transport sehr komplex ist, werden nur auf einige Aminosäuren exemplarisch verfolgt. Es handelt sich dabei um die neutralen Aminosäuren Asparagin und Alanin, die sauren Aminosäuren Glutamat, Aspartat und GABA bzw. die basische Aminosäure Arginin. Die Aminosäuren wählte man so, daß sie alle drei ionischen Klassen vertreten. Auch reduziertes Glutathion spielt beim Transport von Stickstoff im Phloem eine Rolle. Natürlich stellen Aminosäuren und Peptide nur einen Bruchteil aller stickstoffhaltigen Verbindungen in einer Pflanze dar, aus diesem Grund ging man zusätzlich auf den der Stickstofftransport als Ganzes ein. Desweiteren untersuchte man das Siebröhrenexsudat von adulten Pflanzen.

3.2.2.1 Freie Aminosäuren

Die Zusammensetzung der Keimblätter, des Siebröhren- und des Wurzeldruckexsudats bei Keimlingen mit Endosperm ist in Tab. 3.2.4 dargestellt. Diese Verhältnisse änderten sich durch die Equilibrierung der Keimblätter in unterschiedlichen externen Konzentrationen an Glutamin (3 mM, 10 mM und 50 mM).

Die Aspartatkonzentration in den drei Kompartimenten nahm mit steigender Glutaminkonzentration ab, gleiches galt für Glutamat (Abb. 3.2.4). Die Asparaginkonzentrationen stieg hingegen parallel dazu an. Bei ausreichender Stickstoffernährung dienen Asparagin und Glutamin als geeignete N-Transportformen, bei Mangel auch Asparaginsäure und Glutaminsäure. Reduziertes Glutathion, ein Tripeptid aus Glutamat, Glycin und Cystein, kam zu gleichen Anteilen in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat vor, seine Konzentration war unabhängig von der apoplastischen Glutaminkonzentration. Es gelangt wahrscheinlich auf symplastischen Wege ins Phloem und dient zum antioxidativen Schutz und als Schwefelspeicher. Im Wurzeldruckexsudat der inkubierten Keimlinge konnte es nicht nachgewiesen werden.

Tab. 3.2.4 Konzentrationen der freien Aminosäuren in den Keimblättern, im Siebröhren- und im Wurzeldruckexsudat von sechs Tag alten Ricinuskeimlingen mit Endosperm. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Gehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=4).

Aminosäuren	Keimblätter	Konzentrationen [mM]	
		Phloem	Xylem
neutral			
asn	4,16 ± 0,73	3,96 ± 0,65	5,63 ± 0,40
ser	7,39 ± 1,76	12,20 ± 0,81	9,65 ± 0,73
gln	139,72 ± 18,32	42,63 ± 8,82	13,99 ± 2,12
gly	6,92 ± 2,17	7,58 ± 1,81	5,82 ± 0,96
thr	15,75 ± 3,74	13,65 ± 2,85	13,75 ± 3,09
ala	5,36 ± 1,30	0,65 ± 0,31	1,72 ± 0,56
tyr	13,23 ± 0,36	2,08 ± 0,85	2,74 ± 0,89
met	1,75 ± 0,36	0,46 ± 0,33	1,78 ± 0,31
phe	5,03 ± 0,99	15,83 ± 3,97	9,18 ± 2,36
ile	3,60 ± 0,49	16,52 ± 2,37	14,80 ± 2,35
leu	5,91 ± 0,88	8,48 ± 2,31	6,89 ± 1,35
sauer und basisch			
asp	4,81 ± 0,92	3,07 ± 0,56	1,37 ± 0,41
glu	14,05 ± 1,63	5,93 ± 0,94	7,23 ± 0,85
arg	18,24 ± 5,35	18,54 ± 2,25	15,81 ± 2,28
lys	0,85 ± 0,37	18,17 ± 2,83	13,38 ± 1,42
gsh	2,73 ± 1,11	4,95 ± 1,00	0,53 ± 0,33
GABA	6,02 ± 1,49	10,97 ± 3,13	8,59 ± 2,20
trp/val	8,76 ± 0,99	6,40 ± 1,26	24,76 ± 3,83

Üblicherweise wird die Bildung von Arginin durch Stress gefördert (Stress siehe Abschnitt 3.1.2.2; Bogges, 1976; Andersen *et al.*, 1993). Die Phloembeladung soll auf symplastischem Wege erfolgen. Es war in relativ hohen Konzentrationen in den drei Kompartimenten enthalten. Auch Alanin wird nach Schobert und Komor (1989) symplastisch ins Phloem beladen und ist vermutlich zusammen mit GABA ein Abbauprodukt der Glutaminsäure. Eine Korrelation zwischen der Alanin- und der GABA-Konzentration trat v.a. in den Keimblättern auf. Ein Zusammenhang zwischen der Alanin- und der Glutamatkonzentration konnte nicht gefunden werden. Bisher ist die physiologische Funktion von GABA in Pflanzen noch nicht eindeutig geklärt. Man spricht von einer Beteiligung bei der pH-Regulation, der Entwicklung und der Abwehr. Es könnte aber auch zur N-Speicherung beitragen (Shelp *et al.*, 1999). In Tieren spielt GABA eine wichtige Rolle als Regulator von Anionen-Kanälen (Bormann, 1988).

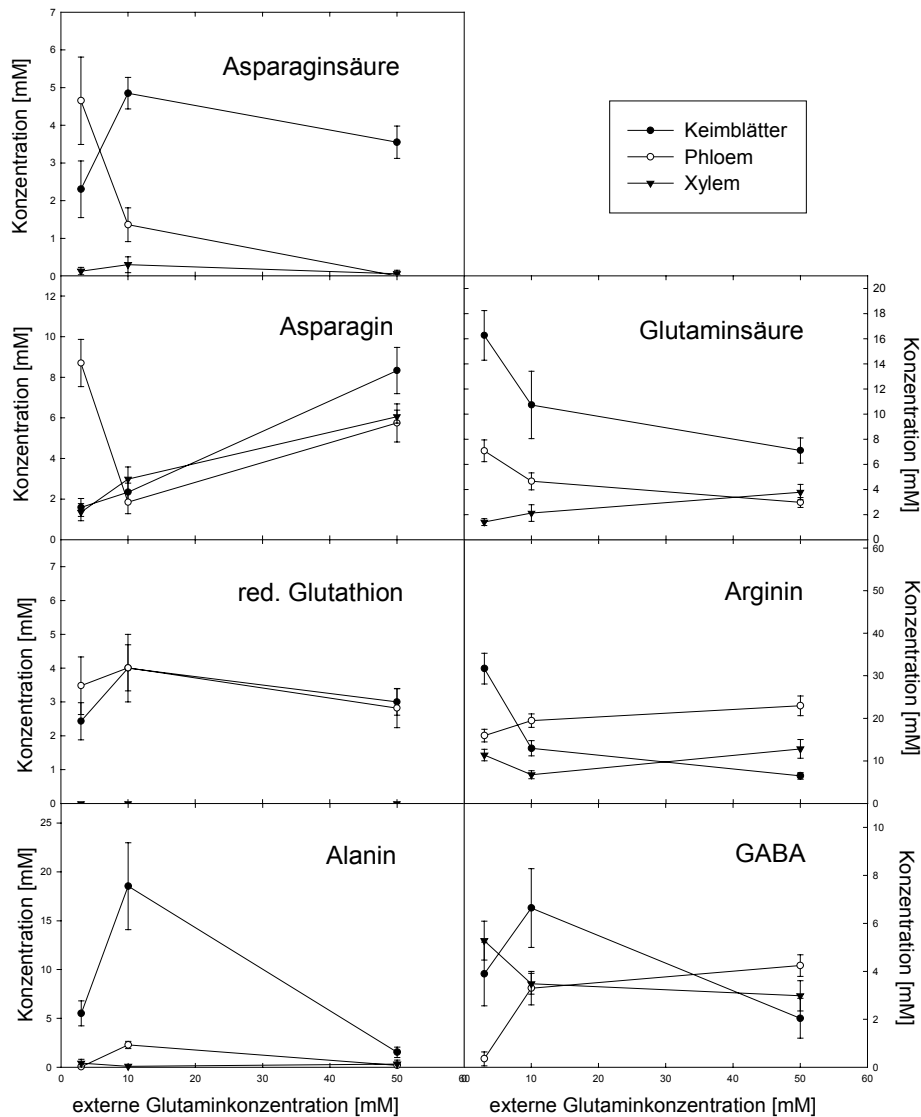


Abb. 3.2.4 Konzentrationen der freien Aminosäuren in den Keimblättern, im Siebröhren- und im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach 10stündiger Inkubation der Keimblätter in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und 3 mM, 10 mM bzw. 50 mM Glutamin. Die Konzentrationen in den Keimblätter wurde aus dem Gehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

3.2.2.2 Stickstofftransport

Aus den Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren wurde auf die Konzentration des in Aminogruppen gebundenen Stickstoffs hochgerechnet. Zusätzlich wurde der Stickstoffanteil in den einzelnen Kompartimenten bestimmt und zur besseren Vergleichbarkeit in eine Konzentration umgerechnet, ungeachtet der Tatsache, daß Stickstoff zumindest in den Keimblättern nicht nur in löslicher Form vorkommt (Tab. 3.2.5).

Nach Equilibrierung in unterschiedlichen Konzentrationen an apoplastischem Glutamin kam es im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm zu einer Veränderung des N-Transports insgesamt. Während 3 mM zu einer Verarmung an Stickstoff führten, erhöhten 10 mM bzw. 50 mM Glutamin die Stickstoffkonzentration der Keimblätter, des Siebröhren- und des Wurzeldruckexsudats. Die Veränderungen waren fast ausschließlich durch die Verschiebung der Glutaminkonzentration bedingt, zusätzlich waren durch Vergleich der Differenzen weitere Tendenzen erkennbar. Es kam zusätzlich zum Glutaminexport auch zu einem Export anderer N-haltiger Verbindungen. Glutamin wurde während der Inkubation stetig metabolisiert und zwar in organische N-Verbindungen außer Aminosäuren, denn bei ausreichender Glutaminversorgung waren prozentual weniger Aminosäuren in den Keimblättern vorhanden. Umgekehrt fand man bei Mangelernährung anteilig mehr freie Aminosäuren in den Keimblättern. D.h. war mehr freies Glutamin in den Keimblättern vorhanden wurde der Export anderer Aminosäuren erhöht. Wurde der Aminosäureexport in den *sink* verringert, nahm auch der Rücktransport im Xylemtransport ab.

Tab. 3.2.5 Vergleich der Konzentrationen an Glutamin (gln-N), Amino-N und N bei sechs Tage alten Ricinuskeimlingen mit Endosperm und bei in 3 mM, 10 mM oder 50 mM Glutamin inkubierten Keimlingen. Angegeben sind Mittelwerte auf 4 Messungen (Keimlinge mit Endosperm) und nach Etablierung der neuen *steady state*-Bedingungen. Die Konzentrationen in den Keimblättern wurde aus dem Gehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % und unter der Annahme, das N nur in löslicher Form vorliegt, errechnet.

externe Bedingungen	Konzentrationen [mM]			
	mit Endosperm	3 mM	10 mM	50 mM
Keimblätter				
gln-N	76	52	320	538
Amino-N	337	287	389	640
N	1012	970	1200	1380
Phloem				
gln-N	152	44	114	210
Amino-N	294	258	448	537
N	550	400	700	1000
Xylem				
gln-N	28	16	50	88
Amino-N	206	108	190	266
N	200	120	240	330

Unabhängig von der externen Glutaminkonzentration wurde der Stickstofftransport im Xylem fast ausschließlich durch Aminosäuren getragen. Im Phloem wurde N nur zu 60 % in Form von freien Aminosäuren translokiert. Einige der bislang im Phloem gefundenen N-haltigen Substanzen sind in Tab. 3.2.6 aufgelistet. Außerdem kommen im Siebröhrenexsudat noch Hormone, Alkaloide, RNA und Glucosamine vor (Abschnitt 1.3). Es muß aber noch weitere, unidentifizierte N-Quellen geben. Möglicherweise handelt es sich dabei um Purin- und Pyrimidinbasen, deren Stoffwechsel eng mit dem von Glutamin verbunden ist und die zusammen

mit Nukleosiden reichlich aus dem Endosperm mobilisiert werden (Langenberger, 1994; Kombrink und Beevers, 1983).

Tab. 3.2.6 Konzentrationen, berechnet auf der Basis der N-Atome, einiger stickstoffhaltigen Substanzen im Phloem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen mit Endosperm.

20 mM N	Prolin	Schobert, 1988
48 mM N	Ricinin	Holfelder <i>et al.</i> , 1998
5 mM N	ATP	siehe Abschnitt 3.1
4 mM N	Polyamine	Antognoni <i>et al.</i> , 1998
5 mM N	Nukleotide	Lehmann, 1981
2 mM N	Proteine	Sakuth <i>et al.</i> , 1993

Insgesamt bedeutet dies, daß die Keimblätter unabhängig vom externen Glutaminangebot netto Stickstoff verloren. Nach Transfer in 3 mM kehrte nur ungefähr 1/3 des exportierten Stickstoffs, v.a. in Form von Aminosäuren, in die Keimblätter zurück. Bei den beiden anderen apoplastischen Konzentrationen annähernd 70 % bis 80 % (Tab. 3.2.7).

Tab. 3.2.7 *Steady state*-Massenflußraten von Stickstoff im Phloem und Xylem sechs Tage alter Ricinuskeimlinge nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Glutamin in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situationen und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	N-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Phloem	Xylem
3 mM Glutamin	14,6 \pm 2,0	5,8 \pm 1,1
10 mM Glutamin	16,8 \pm 2,5	11,5 \pm 1,4
50 mM Glutamin	18,4 \pm 2,5	15,2 \pm 2,1

3.2.2.3 Freie Aminosäuren im Siebröhrenexsudat adulter Ricinuspflanzen

In den Keimlingen zirkulieren große Mengen an reduziertem Stickstoff. Die Substrataufnahme erfolgt über die Keimblätter, der Export in den *sink* über das Phloem. Die nicht quantitativ im *sink* verbrauchten Substrate wurden, wie gezeigt, über das Xylem zurück in die Keimblätter importiert. Anders verhält es sich bei adulten Pflanzen, diese nehmen N üblicherweise als Nitrat oder Ammonium über die Wurzel auf. Während Ammonium direkt in den Stoffwechsel einfließt, muß Nitrat zuerst reduziert werden. Die Synthese zu Aminosäuren bzw. die Reduktion und der nachfolgende Einbau in organische Verbindungen kann sowohl in der Wurzel als auch in den Blättern erfolgen. Eine Zirkulation über das Phloem ist denkbar. Die Vermutung scheint bestätigt, da die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren, insbesondere Glutamin, im Siebröhrenexsudat sehr hoch waren (Tab. 3.2.8; Xylem vgl. Schurr, 1991). Eine Aussage über die Massenflußraten ist nicht möglich, da Flußmessungen bislang fehlen. Die Nitratkonzentration

betrug durchschnittlich 2,80 mM. Der Stickstoffanteil lag bei ca. 4,40 %. Die Exsudatnahme erfolgte in der Mitte der Lichtphase.

Tab. 3.2.8 Aminosäuren im Siebröhrenexsudat 30 Tage alter Ricinuspflanzen. Die Pflanzen wurden nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit ammoniumnitrathaltiger Nährlösung. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=6).

	Konzentrationen [mM]	
	Mittelwert	Standardabweichung
gsh	3,15	1,05
asp	5,07	1,04
glu	10,85	2,00
asn	2,59	0,54
ser	6,42	1,02
gln	89,33	36,75
gly	6,92	2,17
thr	11,38	3,26
arg	13,51	3,61
ala	19,07	3,34
GABA	5,67	1,48
tyr	5,66	0,76
met	2,77	0,99
phe	2,41	0,80
ile	4,81	0,97
leu	6,09	1,99
lys	0,42	0,28

3.2.3 Vergleich des Ferntransports stickstoffhaltiger Verbindungen mit dem Ferntransport von Saccharose

Das Element Kohlenstoff wird im Ricinuskeimling v.a. in Form von Saccharose, in geringerem Anteil auch durch Aminosäuren translokiert (Komor *et al.*, 1996). Obwohl am Saccharosetransport bereits intensiv geforscht wurde (Kallarackal *et al.*, 1989; Orlich und Komor, 1992; Köckenberger, 1995; Orlich, 1998), lag bislang noch keine Bilanzierung der Flüsse durch den Blattapoplasten vor. Eine besonders detaillierte Beschreibung des Saccharosestatus der Keimblätter, des Phloemexports und der unidirektionalen Aufnahme in den Symplasten der Keimblätter wurden von Orlich (1998) durchgeführt. Hierzu inkubierte man intakte Keimlinge mit ihren Keimblättern in 10 mM, 100 mM und 300 mM Saccharose.

Zuckertransport im Xylem

Um eine mögliche Rezirkulation von Kohlenhydraten über das Xylem zurück in den Blattapoplasten zu quantifizieren, wurde die Konzentrationen der löslichen Zucker im Wurzeldruckexsudat gemessen, das pro Zeiteinheit austretende Exsudatvolumen bestimmt und die Massenflußrate errechnet. Zur Etablierung der *steady state*-Situation inkubierte man die Keimblätter intakter Keimlinge in 10 mM, 100 mM oder 300 mM Saccharose (s.o.). Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm (Abb. 3.2.5).

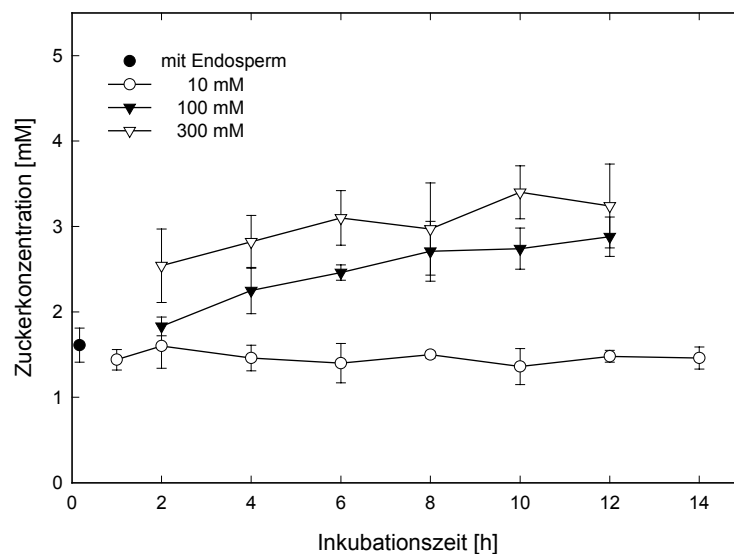


Abb. 3.2.5 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen der löslichen Zucker (Summe aus Glukose und Fruktose) im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Saccharose in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 10 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

Es war *nach Korrektur* (Abschnitt 3.1.3.2) keine Saccharose im Wurzeldruckexsudat nachweisbar. Die Vorkommen der Hexosen (Glukose und Fruktose) wurde durch die apoplastischen Bedingungen beeinflusst. Bei Keimlingen mit Endosperm fand man $0,73 \pm 0,11$ mM Glukose und $0,88 \pm 0,08$ mM Fruktose. Während diese Konzentrationen nach Transfer in 10 mM Saccharose unverändert blieben, nahmen sie bei 100 mM und bei 300 mM apoplastischer Saccharose zu. Die Massenflußrate eines Stoffes ist das Produkt aus der Stoffkonzentration und der Volumenflußrate in der jeweiligen Leitbahn. Die Volumenflußrate ergibt sich wiederum aus dem pro Zeiteinheit gewonnene Exsudatvolumen. Sie schwankte zwischen $44\text{--}52 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Die Bestimmung der Massenflußraten erbrachten bei Keimlingen mit Endosperm $0,041 \pm 0,001 \mu\text{Mol Glukose} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ und $0,049 \pm 0,01 \mu\text{Mol Fruktose} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$.

Inkubierte man Keimlinge mit ihren Keimblättern in 10 mM sank die Raten, wie in Tab. 3.2.9 gezeigt, leicht ab, während 100 mM oder 300 mM externe Saccharose die Massenflußraten der Hexosen im Xylem anstiegen ließen.

Tab. 3.2.9 *Steady state*-Massenflußraten der löslichen Zucker (Glukose und Fruktose) im Xylem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Saccharose in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Massenflußraten der löslichen Zucker [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Glukose	Fruktose
10 mM Saccharose	0,036 \pm 0,002	0,035 \pm 0,001
100 mM Saccharose	0,061 \pm 0,002	0,066 \pm 0,001
300 mM Saccharose	0,068 \pm 0,005	0,070 \pm 0,003

Um einen Hinweis darauf zu finden, ob es bei adulten Pflanzen zu einer Rezirkulation von Saccharose kommt, wurde auch hier Wurzeldruckexsudat gewonnen. Die Exsudatnahme erfolgte in der Mitte der Lichtphase, die Pflanzen waren 40 Tage alt und in der Klimakammer angezogen. Man fand zwischen 2 und 11 mM Saccharose, die Konzentrationen der Hexosen lagen zwischen 1 und 6 mM (n=8).

Der Zuckertransport im Xylem des Ricinuskeimlings waren zu allen Zeiten gering, d.h. der *sink* speichert oder verbraucht die angelieferten Zucker annähernd quantitativ, nur ein kleiner Teil wird in Form von Hexosen über das Xylem zurück in den Blattapoplasten transportiert werden. Auch bei adulten Pflanzen (40 Tage alt) fand man im Wurzeldruckexsudat nur geringe Konzentrationen an Zuckern. Im Vergleich zu den *immensen* Stickstoffflüssen hat der Xylemtransport von Zuckern keinen entscheidenden Einfluß auf die Ernährung der Pflanze.

3.2.4 Nitrattransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten

Der stete Export von Aminosäuren aus der Wurzel ist nur möglich, wenn Aminosäuren aus dem Wurzelsymplasten in den Wurzelapoplasten abgegeben werden. Alternativ können Aminosäuren oder andere stickstoffhaltige Verbindungen, die über das Phloem in den Wurzelapoplasten geliefert wurden, über das Xylem zurück in den Sproß zirkulieren. Wird Nitrat als N-Quelle angeboten, läßt sich auch Nitrat im Xylem nachweisen (Kirkby und Armstrong, 1980). Nitrat ist nur eingeschränkt im Phloem mobil (Schobert und Komor, 1992), kann aber in der Wurzel und in den Blättern durch das Enzym Nitratreduktase reduziert werden, um dann in Form von Glutamin oder anderer N-haltiger Verbindungen über das Phloem zu rezirkulieren.

3.2.4.1 Nitrattransport im Xylem und Import in die Keimblätter

Bei Keimlingen mit Endosperm fand man kein Nitrat im Wurzeldruckexsudat. Überführte man die Wurzel in nitrathaltiges Medium, konnte im Wurzeldruckexsudat Nitrat nachgewiesen werden (Abb. 3.2.6). Die jeweiligen Nitratkonzentrationen waren gering. Sie lagen, abhängig von der apoplastischen Konzentration, zwischen 0,5 mM und 1,2 mM. Rückschlüsse über die Induktion der Nitratreduktase in der Wurzel konnten nicht gezogen werden. Clarkson (1985) spricht von einer Dauer von 8 Stunden, die zur vollständigen Induktion notwendig sind. Andere Autoren sprechen von einer bis 3 Stunden (Kronzucker *et al.*, 1995).

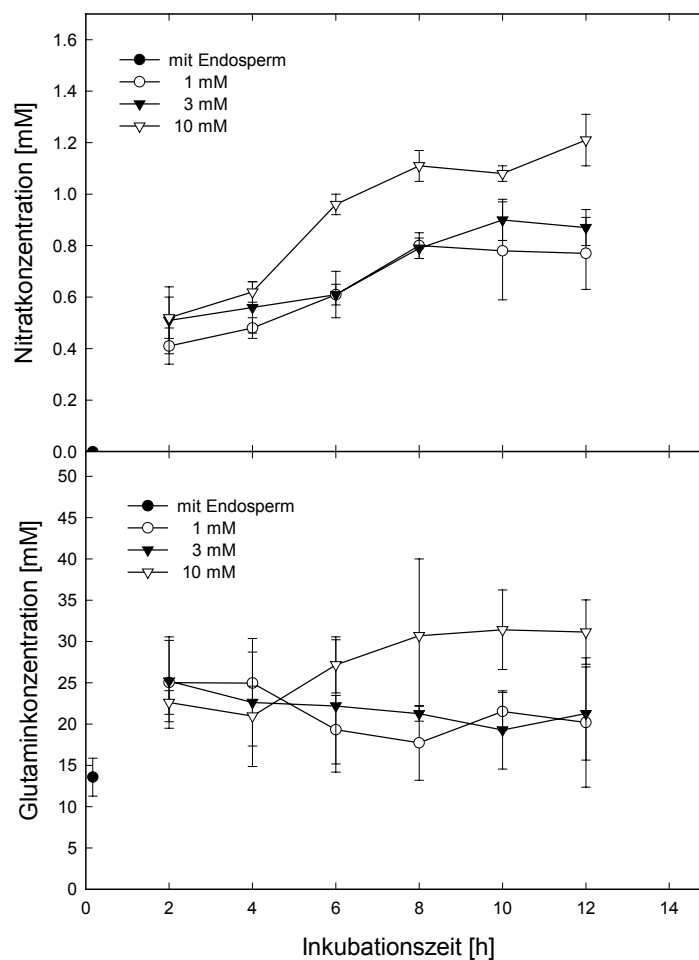


Abb. 3.2.6 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Nitrat und Glutamin im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Nitrat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 40 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

Reduzierter Stickstoff wird im Ricinuskeimling hauptsächlich in Form von Glutamin transportiert, deshalb wurden nicht nur die Nitrat- sondern auch die Glutaminflüsse verfolgt. Die Glutaminkonzentration im Wurzeldruckexsudat war schon bei geringem Nitratangebot hoch und durchaus vergleichbar mit derjenigen bei 10 mM Glutamin im Blattmedium. Bei allen Bedingungen lag die Nitratkonzentration der Keimblätter zwischen ca. 0,2 mM und 0,5 mM Nitrat. Eine Abhängigkeit vom externen Angebot war eindeutig, aber gering. Die Glutaminkonzentration in den Keimblättern war etwas gesteigert im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm, aber ähnlich der Konzentration nach Inkubation 10 mM externem Glutamin an den Keimblättern (Abb. 3.2.7).

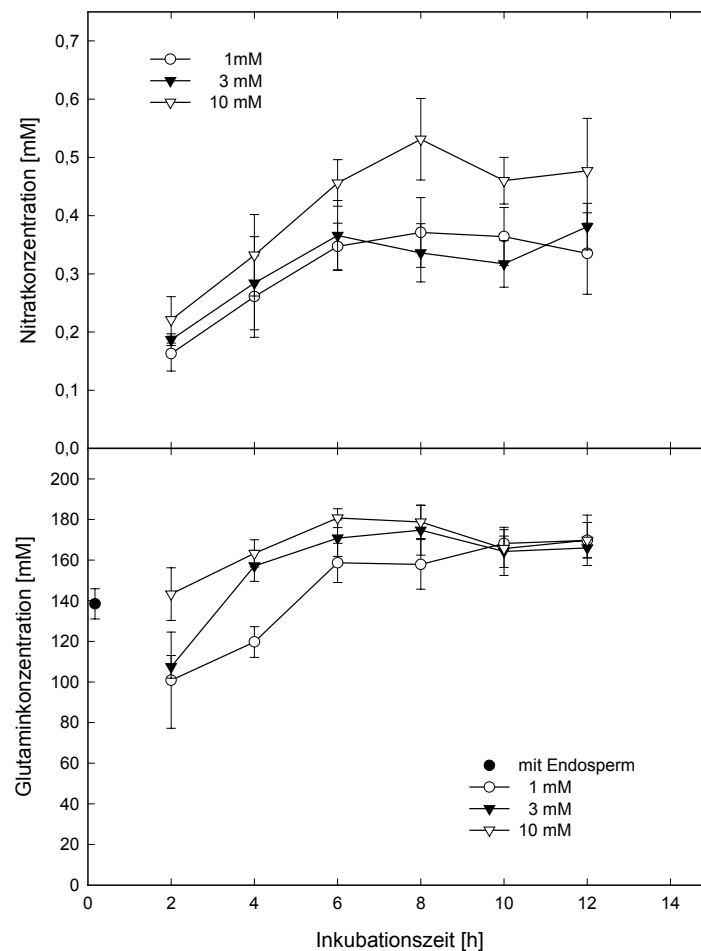


Abb. 3.2.7 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Nitrat und Glutamin in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Nitrat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Konzentrationen in den Keimblättern wurden unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

3.2.4.2 Vergleich des Langstreckentransports in Phloem und Xylem

Es wird davon ausgegangen, daß Nitrat nahezu phloemimmobil ist, nur bei übermäßigem apoplastischen Nitratangebot scheint es, daß auch Nitrat ins Phloem gelangen kann (Schobert und Komor, 1992). Nachdem die Nitratkonzentration in den Keimblättern gering war, wurde auf die Analyse des Siebröhrenexsudats verzichtet. Die Glutaminkonzentration im Siebröhrenexsudat war in allen drei Fällen bereits nach 2stündiger Inkubation höher als bei den Keimlingen mit Endosperm und unabhängig von der Veränderung der Nitrat- und Glutaminkonzentration im Wurzeldruckexsudat (Abb. 3.2.8).

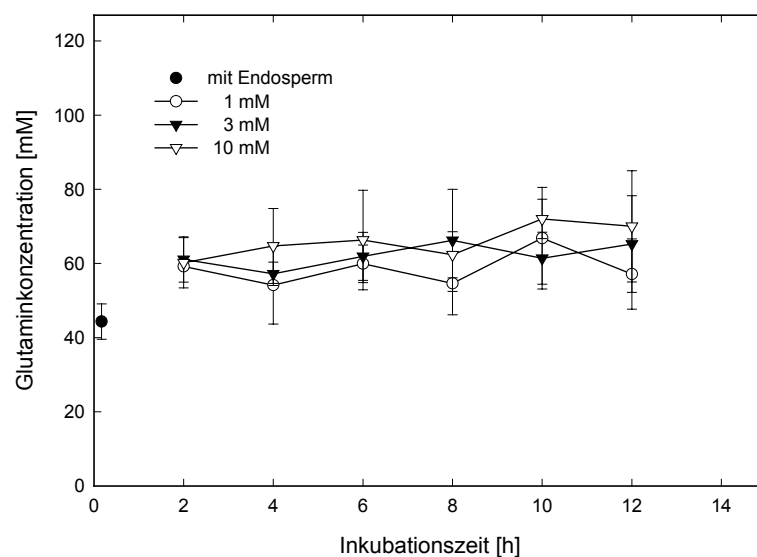


Abb. 3.2.8 Etablierung des *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Glutamin im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, CaCl_2 und Nitrat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 20 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Die Glutaminflüsse in den beiden Leitbahnen unterschieden sich nach Transfer in 1 mM und 3 mM Nitrat nicht, nur bei 10 mM Nitrat kam es zu einem erhöhten Glutamineintrag in die Keimblätter, der sich jedoch nur unwesentlich in einem Anstieg der Glutaminkonzentration dort widerspiegelte. Es scheint, daß der Großteil des angelieferten Glutamins direkt wieder ins Phloem beladen wird (Tab. 3.2.10). Während die Volumenflußraten im Xylem zwischen 40 und 50 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ lagen, betrugen sie im Phloem 14-18 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$.

Tab. 3.2.10 *Steady state*-Massenflußraten für Glutamin im Xylem und Phloem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Nitrat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Glutamin-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Xylem	Phloem
1 mM Nitrat	0,95 \pm 0,07	0,85 \pm 0,09
3 mM Nitrat	0,98 \pm 0,04	0,90 \pm 0,17
10 mM Nitrat	1,49 \pm 0,02	1,03 \pm 0,03

3.2.4.3 Verbleib des über die Wurzel aufgenommenem Nitrats

Um den Verbleib des Nitrats genauer zu analysieren, wurden Keimlinge mit ihrer Wurzel acht Stunden (*steady state*-Situation) in 1 mM, 3 mM und 10 mM Kaliumnitratlösung vorinkubiert und anschließend für 10 min in eine Lösung mit ¹⁵N-markiertem Kaliumnitrat überführt (Ausgangsbedingungen: 0 min). Es erfolgte ein erneuter Transfer in nicht markiertes Kaliumnitrat. Die Inkubationszeit betrug nun 2 bzw. 4 min. Danach wurden die Keimblätter geerntet und der Anteil des stabilen Isotops am Stickstoffgehalt bestimmt, davon ausgehend wurde auf den Eintrag pro Zeiteinheit (Fluß) hochgerechnet. Es wurde folglich die Akkumulation der Markierung in den Keimblättern verfolgt (Tab. 3.2.11).

Tab. 3.2.11 ¹⁵N-Flüsse in die Keimblätter von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen bestimmt anhand des ¹⁵N-Anteils in den Keimblättern. Die Wurzeln wurden in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und 1 mM, 3 mM und 10 mM ¹⁵N-Kaliumnitrat inkubiert. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Ausgehend von der *steady state*-Situation erfolgte ein 10minütiger *pulse* in markierter Lösung (0 min), gefolgt von einem 2- bzw. 4minütigen *chase*. Berechnet wurden diese Flüsse jeweils vom Nullpunkt (0 min) ausgehend. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben (n=5).

externe Bedingungen	¹⁵ N-Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	0-2 Minuten	0-4 Minuten
1 mM Nitrat	0,216	0,191
3 mM Nitrat	0,537	0,179
10 mM Nitrat	0,874	0,214

Der jeweils geringe Anteil des stabilen Stickstoffisotops an dem Stickstoffgehalt zeigte aufgrund der Größe des Stickstoffpools in den Keimblättern nur unwesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationsbedingungen. Deshalb wurden die Meßwerte in Flüsse (Import in die Keimblätter) umgerechnet. Aus dem Vergleich der Flüsse nach 2 Minuten und nach 4 Minuten Inkubation läßt sich folgendes schlußfolgern: Die in die Keimblätter importierte Markierung wurde bei N-Mangel (1 mM externes Nitrat) vermehrt in den Keimblättern zurückbehalten. Bei *guter* Versorgung (3 und 10 mM Nitrat) zirkulierten N-haltige Verbindungen zwischen Xylem und Phloem.

Zusätzlich wurde die Anzahl der Xylemgefäße im Bereich des basalen Hypokotyl bestimmt. Es waren 18 Gefäße pro Leitbündel. Die Dimensionen wurden mit den Ergebnissen von Köckenberger *et al.* (1997) gleichgesetzt.

Nach Nitratkubation stellte sich die Frage nach dem Verbleib des aufgenommenen Nitrats. Bekannt ist, daß der Wasserfluß im Keimling $2\text{--}3\text{ cm} \times \text{min}^{-1}$ beträgt (Köckenberger *et al.*, 1997). Innerhalb von 2 min erreicht ein Wassermolekül mit dem Xylemfluß die Keimblätter, in 4 min kann es theoretisch bereits wieder ins Phloem beladen und in die Wurzel transportiert worden sein. Gleiches scheint für die Substratflüsse zu gelten. Erfolgte nach einem 10minütigen ^{15}N -pulse ein 2- bzw. 4minütiger *chase* kam es bei ausreichender N-Versorgung nicht zur *erwarteten* Reduktion des errechneten Flusses in die Keimblätter (ohne Rezirkulation) sondern zu einer wesentlich *stärkeren Abnahme* (Rezirkulation). Diese kann nur aufgrund eines erneuten Exportes der die Markierung tragenden N-haltigen Verbindungen zustande kommen.

3.2.5 Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.2.12) sind die nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten und nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten erzielten Glutamin-Massenflüsse in Phloem und Xylem einander gegenübergestellt. Glutamin wurde über die Keimblätter angeboten, für die Inkubation über die Wurzel wählte man Nitrat.

Tab. 3.2.12 Vergleich der *steady state*-Massenflußraten im Phloem und Xylem nach Equilibrierung von Glutamin über den Keimblattapoplasten oder Nitrat über den Wurzelapoplasten.

externe Bedingungen	Equilibrierung über Keimblätter	Equilibrierung über Wurzel	externe Bedingungen
	Phloem	Phloem	
3 mM Glutamin	$0,47 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,03$	1 mM Nitrat
10 mM Glutamin	$0,96 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,17$	3 mM Nitrat
50 mM Glutamin	$1,87 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,03$	10 mM Nitrat
	Xylem	Xylem	
3 mM Glutamin	$0,37 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,07$	1 mM Nitrat
10 mM Glutamin	$1,01 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,04$	3 mM Nitrat
50 mM Glutamin	$2,03 \pm 0,13$	$1,49 \pm 0,02$	10 mM Nitrat

3.2.6 Saccharosetransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten

Unter *in vivo*-Bedingungen, aber auch nach Veränderung des Saccharoseangebots in der Apoplastenlösung der Keimblätter, kam es zu keinem Saccharosetransport im Xylem (Abb. 3.2.5). Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß es unter diesen externen Bedingungen an den Keimblättern zu keinem Überangebot von Saccharose im extrazellulären Raum der Wurzel kam. Es stellt sich die Frage, wie sich Saccharose auf den Xylemtransport auswirkt, wenn sie in großen Mengen direkt über den Wurzelapoplasten angeboten wird. Hierzu wurden intakte Keimlinge mit ihren Wurzeln in 10 mM, 100 mM und 300 mM Saccharose inkubiert. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 ein. Bestimmt wurde die Saccharosekonzentration und die Konzentration der Hexosen. Die Massenflußraten wurden unter Einbezug der Volumenflusses errechnet.

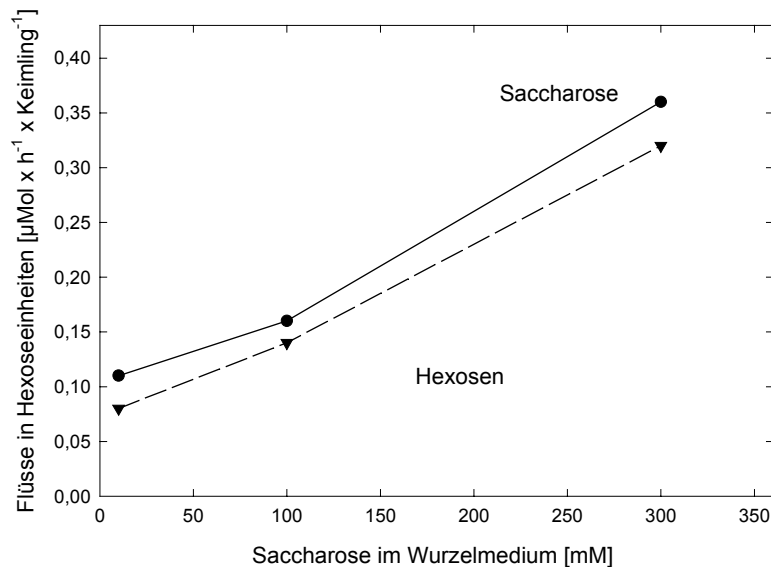


Abb. 3.2.9 *Steady state*-Flüsse in Hexoseeinheiten der löslichen Zucker im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl_2 in 10 mM, 100 mM und 300 mM Saccharose. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 10 min. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben.

Betrachtet man den Xylemtransport der löslichen Zucker, fällt auf, daß er sich in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration an der Wurzel veränderte (Abb. 3.2.9). Die resultierende Saccharosekonzentration waren im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm (ca. 200 mM) unerwartet hoch, gleiches galt für die Siebröhrenexsudate (Tab. 3.2.13). Die Unterschiede zwischen den einzelnen externen Bedingungen waren vernachlässigbar. Der Volumenfluß im Phloem schwankte zwischen 11 und 21 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$, im Xylem zwischen 45 und 50 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Die Saccharoseflüsse im Phloem stiegen somit von 4,35 auf 4,75 und 4,83 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$.

Tab. 3.2.13 *Steady state*-Konzentrationen für Saccharose in den Keimblättern, im Siebröhren- und im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Saccharose in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Saccharose-Konzentrationen [mM]		
	Keimblätter	Siebröhrenexsudat	Wurzeldruckexsudat
10 mM Saccharose	312 ± 13	190 ± 5	1,23 ± 0,34
100 mM Saccharose	313 ± 20	197 ± 36	1,44 ± 0,37
300 mM Saccharose	339 ± 10	202 ± 21	2,03 ± 0,19

Insgesamt gesehen kam es auch nach Angebot von Saccharose im Wurzelapoplasten zu keinem wesentlichen Saccharosetransport im Xylem. Der Phloemfluß entsprach bei allen Bedingungen demjenigen nach Equilibrierung in 10 mM Saccharose über den Keimblattapoplasten.

Bedeutung des Saccharoseexports aus dem Wurzelapoplasten

Sicherlich ist die Saccharoseaufnahme über die Wurzel weit weg von den natürlichen Bedingungen, aber diese Versuchsreihe kann indirekt einen weiteren Beitrag zur Möglichkeit der Rückgewinnung durch die Wurzel liefern. Schobert (1988) verfolgte diesen Vorgang, indem er ¹⁴C-markierte Saccharose (50 mM) an den Keimblättern und nicht markierte Saccharose an der Wurzel anbot. Er fand einen Saccharoseefflux in den Wurzelapoplasten. Die Anwesenheit von Saccharose an der Wurzel wirkte limitierend auf die Aufnahme von Saccharose in die Wurzelzellen. Wurde die Energetisierung der Wurzel durch 10 µM FCCP beeinträchtigt, verlor die Wurzel, auch ohne Anwesenheit von Saccharose, Markierung. Saccharose, die in den Wurzelapoplasten entlassen wurde, kann carrier-vermittelt wieder in die Zellen aufgenommen werden.

3.2.7 Unterteilung des Keimlings in *source* und *sink* am Beispiel des Kohlenstoffhaushalts

Der wachsende Ricinuskeimling erhält seine Nährstoffe vom Endosperm. Die Keimblätter nehmen diese Substrate aktiv aus dem Apoplasten auf (Saccharose: Komor, 1977; Bick *et al.*, 1998b; AS: Robinson und Beevers, 1981a; Bick *et al.*, 1998a). Orlich (1998) konnte zeigen, daß ca. 80 % der aus dem Endosperm aufgenommenen Saccharose über das Phloem exportiert werden. Die restlichen 20 % dienen als Substrat für die Atmung (Black *et al.*, 1987), oder auch für Synthesereaktionen, beispielsweise der Zellwandsynthese (Hendrix, 1990) und dem Aufbau von Stärke (Sung *et al.*, 1989). Die Möglichkeit der übermäßigen Speicherung von Saccharose in der Vakuole kann vernachlässigt werden, da die Keimblätter im Alter von sechs Tagen kaum vakuolisiert sind (Köhler, 1992). Die Keimblätter dienen somit als *source*-Organe,

stellen entlang des Transportweges aber auch den ersten *sink* dar. Der Schwerpunkt der metabolischen Vorgänge in den Keimblättern liegt auf der Bildung von Stärke.

Spekuliert werden kann, ob es durch das externe Saccharoseangebot im Keimblattapoplasten zu einer Veränderung der Größe des Stärkepools in den Zellen der Keimblätter kommt. Bei Keimlingen mit Endosperm wurden in den Keimblättern $434 \pm 16 \mu\text{Mol}$ Stärke in Hexoseeinheiten $\times (\text{gFG})^{-1}$ gefunden ($n=6$). In Tab. 3.2.14 sind die Stärkegehalte nach Equilibrierung des Keimblattapoplasten in verschiedenen Konzentrationen an Saccharose dargestellt.

Tab. 3.2.14 Stärkegehalt in den Keimblättern nach Inkubation der Keimblätter sechs Tage alter intakter Ricinuskeimlinge in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Saccharose in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Die Inkubationszeit betrug 6 oder 8 Stunden. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben ($n=4$).

externe Bedingungen	Stärkegehalte [$\mu\text{Mol Hexoseeinheiten} \times (\text{gFG})^{-1}$]	
	6 Stunden	8 Stunden
10 mM Saccharose	391 ± 10	387 ± 12
100 mM Saccharose	420 ± 13	419 ± 15
300 mM Saccharose	445 ± 22	446 ± 22

Im Folgenden wurde auf die Kohlenstoffverteilung entlang des Hypokotyls eingegangen (Abb. 3.2.10). In den direkt auf die Keimblätter angrenzenden Abschnitten des apikalen Hypokotyls fand man einen hohen, in der Verdickungszone einen geringeren Gehalt an Kohlenstoff. Unterhalb der Verdickungszone, d.h. im dicken, basalen Abschnitt des Hypokotyls, kam es zu keiner weiteren Veränderung. Bei 7 Tage alten Keimlinge zeigte sich einen vergleichbaren Verlauf. Um den Zusammenhang zwischen der Mobilisierung interner Speicher und der Teilchenaufnahme ins Hypokotyl zeigen zu können, wurde zusätzlich das Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht (TG/FG) ermittelt. Auch das TG/FG zeigte nach dem Apex sein Maximum und fiel im Bereich der Verdickungszone annähernd exponentiell ab (Abb. 3.2.11).

Köckenberger (1995) stellte folgende Überlegungen an: Das TG/FG wird durch den Fluß von Wasser bzw. Nährstoffteilchen in die oder aus den Zellen beeinflusst. Der Ausstrom von Teilchen aus den Zellen verringert das Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht, der Einstrom erhöht es. Wenn das TG/FG während des Wachstums konstant bleibt, muß neben der Teilchenaufnahme eine Wasseraufnahme erfolgen. Folglich stellt der apikale Teil des Hypokotyls den Ort der größten Nettoaufnahme von Nährstoffteilchen im wachsenden Hypokotyl dar. Dies trifft beispielsweise auf Kohlenstoff zu (Abb. 3.2.10; Balane, 1997).

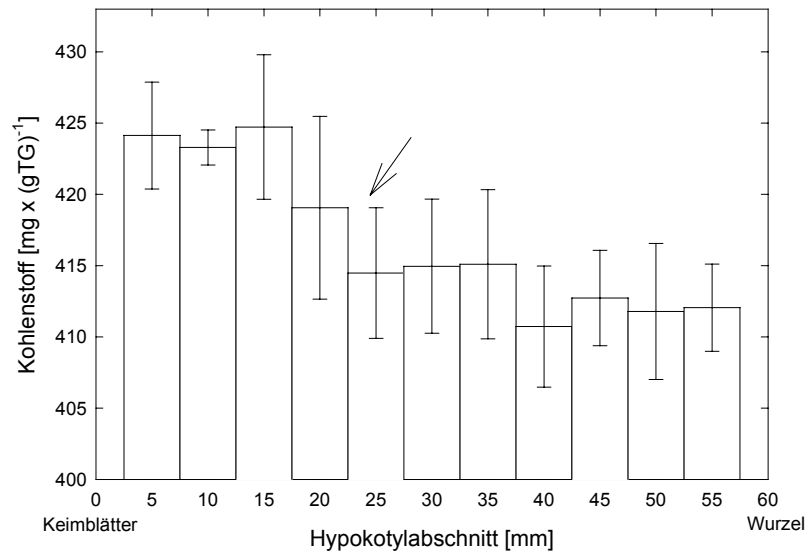


Abb. 3.2.10 Kohlenstoffverteilung entlang des Hypokotyls von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen. Es wurden 5 mm lange Hypokotylabschnitte zur Bestimmung herangezogen. Die Lage der Verdickungszone ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

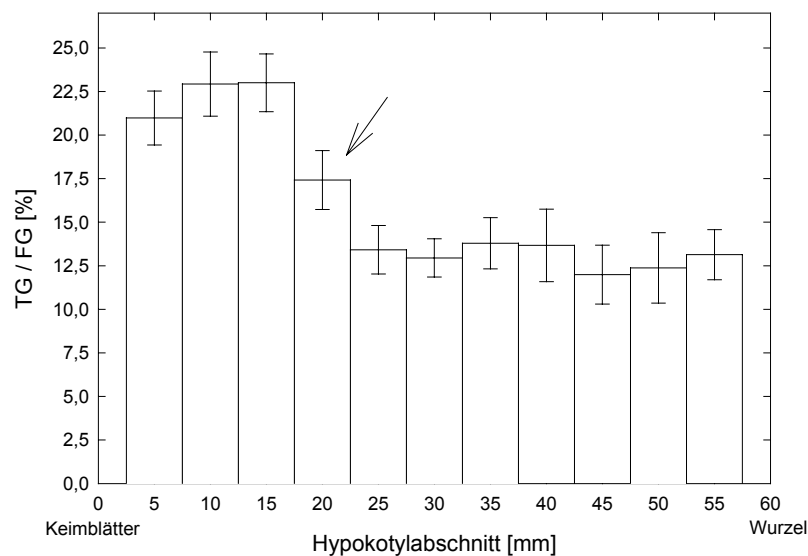


Abb. 3.2.11 Verhältnis von Trockengewicht zu Frischgewicht entlang des Hypokotyls von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen. Es wurden 5 mm lange Hypokotylabschnitte zur Bestimmung herangezogen. Die Lage der Verdickungszone ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

Zur Versorgung des Hypokotyls und der Wurzel wird Saccharose aus den Keimblättern exportiert, entlang des Transportweges wieder aus dem Phloem entladen und für die Entwicklung der Pflanze genutzt. Aufgrund der starken Zellteilungstätigkeit besteht im apikalen Hypokotyl ein hoher Energiebedarf. Um eine kontinuierliche Entladung des Phloems aufrechtzuerhalten, kommt es unter physiologischen Bedingungen zu einer intrazellulären Kompartimentierung der

importierten Saccharose in Form von Stärke. Im apikalen Hypokotyl des sechs Tage alten Keimlings fand man $406 \pm 19 \mu\text{Mol}$ Stärke in Hexoseeinheiten $\times (\text{gFG})^{-1}$. Nach Transfer der Keimblätter in 10 mM Saccharose sank der Stärkegehalt ab. 100 mM und 300 mM Saccharose veränderten den Stärkegehalt hingegen nur unwesentlich (Tab. 3.2.15). Der Kohlenstoffgehalt betrug in diesem Bereich ungefähr $2,60 \text{ mMol C} \times (\text{gFG})^{-1}$ (bei 10 mM Saccharose) und ca. $2,80 \text{ mMol C} \times (\text{gFG})^{-1}$ (bei 100 mM und 300 mM) ($n=10$), wobei Stärke, wie gezeigt, mit ca. 80 % den überwiegenden Anteil der kohlenstoffhaltigen Verbindungen stellte.

Tab. 3.2.15 Stärkegehalt im apikalen Hypokotyl sechs Tage alter Ricinuskeimlinge nach Inkubation der Keimblätter in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Saccharose in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Die Inkubationszeit betrug 6 oder 8 Stunden. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben ($n=4$).

externe Bedingungen	Stärkegehalte [$\mu\text{Mol Hexoseeinheiten} \times (\text{gFG})^{-1}$]	
	6 Stunden	8 Stunden
10 mM Saccharose	320 ± 17	303 ± 10
100 mM Saccharose	409 ± 16	410 ± 16
300 mM Saccharose	427 ± 19	422 ± 17

Der Ricinuskeimling ist ein einfach aufgebautes *source-sink*-System. Während der ersten sieben Tagen seines Wachstums nehmen die Keimblätter Saccharose und andere Nährstoffe aus dem Endosperm auf und exportieren sie in nur eine definierte Richtung zum wachsenden *sink*, dem Hypokotyl und der Wurzel (Kriedemann und Beevers, 1967a,b). Das apikale Hypokotyl ist der Ort der größten Saccharoseentladung (Köckenberger, 1995; Balane, 1997). Es ist dem *sink* zuzurechnen. Die Gewinnung des Siebröhren- und des Wurzeldruckexsudats erfolgte im Bereich des Hypokotylhakens. Die Entladung im apikalen Hypokotyl bleibt somit unberücksichtigt. Trotz dieser Tatsache wird aus methodischen Gründen die Massenflußrate (*Nettotransportrate*) der Exportrate aus den Keimblättern gleichgesetzt. Als Trennungslinie zwischen *source* und *sink* dient der Hypokotylhaken. Der tatsächliche Nährstoffexport aus den Keimblättern wird folglich unterschätzt. Messungen der Massenflußrate im Bereich knapp oberhalb der Verdickungszone ergaben für 100 mM externe Saccharose durchschnittlich $7,45 \pm 0,47 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ ($n=10$) (weitere Massenflußraten: bei 10 mM Saccharose $3,98 \pm 0,56 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ und bei 300 mM Saccharose $6,55 \pm 0,36 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$).

3.2.8 Stickstoffverteilung im Hypokotyl

Entlang des Hypokotyls wurde der Gehalt an Stickstoff bestimmt. Dazu wurde das Hypokotyl in 5 mm lange Abschnitte aufgeteilt und analysiert. Die Stickstoffgehalte (durchschnittlich $30 \text{ mg} \times (\text{gTG})^{-1}$) in den einzelnen Teilen des Hypokotyls der Keimlinge mit Endosperm unterschieden sich kaum, nur im Bereich des Apex bestand ein eindeutiges Maximum. Bei 7 Tage alten Keimlingen zeigte sich einen vergleichbar Verlauf. Der Apex scheint unter *in vivo*-Bedingungen der Ort der größten Entladung des Phloems zu sein. Die Entladungsrate ist nicht bekannt. Nach Transfer der Keimblätter intakter Keimlinge in glutaminhaltiges Medium, veränderte sich der prozentuale Stickstoffanteil des Hypokotyls (Tab. 3.2.16). Die größten Auswirkungen zeigten sich im apikalen Hypokotyl und der Verdickungszone, der in 50 mM externem Glutamin inkubierten Keimlingen.

Tab. 3.2.16 Prozentualer Stickstoffanteil in Hypokotyl und Wurzel von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Etablierung der *steady state*-Situation durch Inkubation in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Glutamin in den angegebenen Konzentrationen. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben (n=4).

externe Bedingungen	Stickstoffanteil [%]			
	apikales Hypokotyl	Verdickungszone	basales Hypokotyl	Wurzel
mit Endosperm	3,95 %	3,80 %	3,75 %	3,75 %
3 mM	3,80 %	3,80 %	3,50 %	3,60 %
10 mM	4,20 %	4,20 %	4,10 %	3,90 %
50 mM	5,10 %	4,90 %	4,50 %	3,90 %

3.2.9 Wechselwirkungen zwischen der Saccharosekonzentration in den Keimblättern und der Kohlenstofftranslokation

Der Kohlenstoffhaushalt im *sink* des Keimlings wird durch den Export aus dem *source* bestimmt. Das Exportsystem im Keimling arbeitet, wie Orlich (1998) zeigen konnte, schon bei weniger als 100 mM externer Saccharose nahe der Sättigung (Abb. 4.1). Tagsüber ist für den adulten *Ricinus* trotz gesteigerter Assimilation keine Erhöhung des Exports zu beobachten (Grimmer und Komor, 1999). Neben dem Export ist auch die intrazelluläre Konzentration vom externen Angebot abhängig. Der Efflux aus den Zellen der Keimblätter ist wiederum von der intrazellulären Saccharosekonzentration bestimmt. Extrapoliert man den unidirektionalen Saccharoseefflux aus den Zellen der Keimblättern ins Medium (Orlich, unveröffentlicht; Bestimmung siehe Abschnitt 2.7.2) gegen die intrazelluläre Saccharosekonzentration, kommt es offenbar unterhalb von 160 bis 180 mM zu keinem weiteren Efflux in den Apoplasten (Abb. 3.2.12). Die Beladung des Phloems mit Saccharose, die v.a. auf apoplastischem Wege erfolgt, dürfte zum Erliegen kommen, wenn gleichzeitig die Nachlieferung aus dem Apoplasten ausbleibt. Um Indizien für diese Annahme zu gewinnen, wurde der Kohlenstofftransport in Keimlingen nach Nährstoffentzug untersucht.

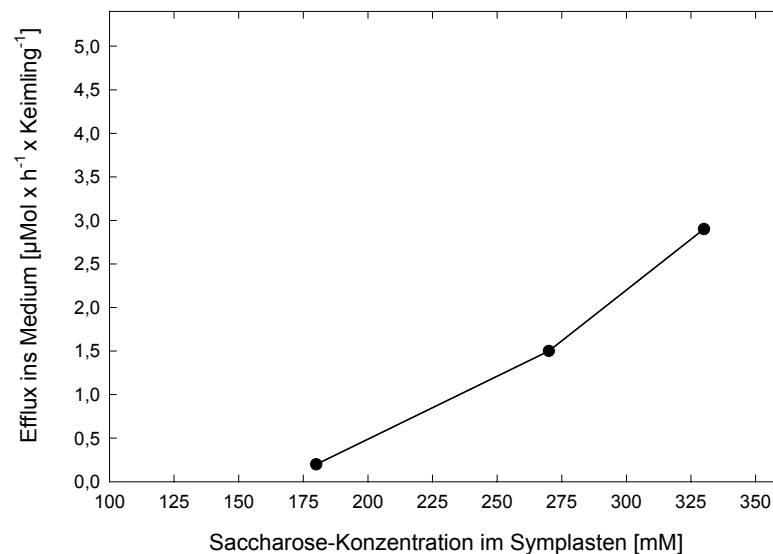


Abb. 3.2.12 Saccharoseefflux aus dem Symplasten der Keimblätter sechs Tage alten Ricinuskeimlingen inkubiert in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und 10 mM, 100 mM, und 300 mM Saccharose. Die symplastische Konzentration wurde aus dem Saccharosegehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet (nach Orlich, 1998; Orlich, unveröffentlicht).

3.2.9.1 Kohlenstofftransport nach fehlender apoplastischer Versorgung

Für diesen Versuchsansatz entfernte man bei drei Tage alten Keimlingen das Endosperm. Die Pflanzen wurden dann entweder sofort geerntet oder bis zu Tag vier, fünf oder sechs in nährstofffreiem Medium angezogen. Es wurde der Kohlenstoff-, der Saccharose- und der Stärkegehalt in den einzelnen Organen analysiert. Eine Exsudatnahme war in diesem frühen Alter nicht möglich. Ziel war es, eine Situation zu erreichen, bei der die symplastische Konzentration einen Wert von 160 mM Saccharose unterschreitet.

Obwohl das Endosperm als Lieferant von Nährstoffen fehlte, fand man zwischen Tag 3 und 4 netto einen Abtransport von Kohlenstoff aus den Keimblättern (Abb. 3.2.13). Zwischen Tag 4 und Tag 5 kehrten sich die Verhältnisse um. Die Wurzel verlor und die Keimblätter gewannen Kohlenstoff. Drei Tage nach Verarmungsbeginn konnte keine Netto-Kohlenstoff-Translokation errechnet werden. Die Atmungsraten in den einzelnen Organen sechs Tage alter Keimlinge wurden von Köckenberger (1995) bestimmt und betrugen in den Keimblättern $0,3$, im Hypokotyl $0,15$ und in der Wurzel $0,26 \mu\text{Mol C in Saccharose-Äquivalenten} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Aus der Konstanz der C-Menge in den Keimblättern und nach Einbezug der Atmungsrate muß man jedoch weiterhin eine C-Translokation v.a. zwischen der Wurzel und den Keimblättern fordern.

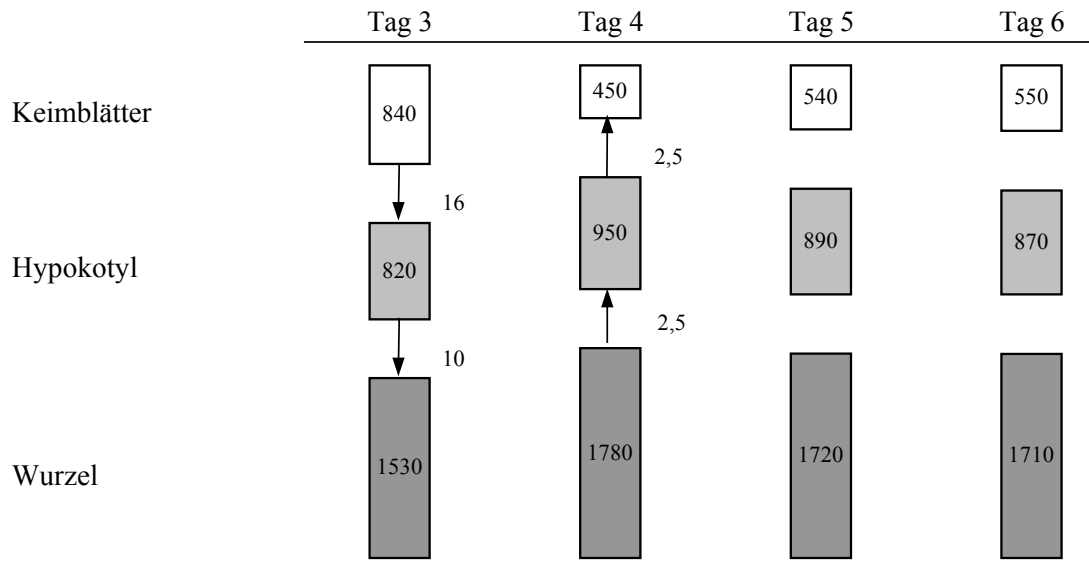


Abb. 3.2.13 Kohlenstoffmenge [μMol] in den einzelnen Organen von Ricinuskeimlinge nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms. Das Endosperm wurde am Tag 3 entfernt. Die Ernte der Gewebe erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Die Translokationsraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] wurden aus dem Zuwachs der verschiedenen Organe errechnet. Sie sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben ($n \geq 4$).

Zwischen Tag 3 und Tag 4 sank die Saccharosekonzentration in den Keimblättern von 426 mM auf 52 mM, damit wurde die vermutete *untere Schwellenkonzentration* für den symplastischen Efflux und den Saccharoseexport unterschritten. Tatsächlich konnte ab Tag 4 auch kein Netto-C-Export aus den Keimblättern mehr nachgewiesen werden, obwohl der Stärkepool noch nicht vollständig mobilisiert war (Tab. 3.2.17).

Tab. 3.2.17 Saccharose- und Stärkegehalte in den Keimblättern nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms. Das Endosperm wurde am Tag 3 entfernt. Die Ernte der Gewebe erfolgte entweder am Tag 3, 4 oder 5. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben ($n \geq 4$).

	Gehalte [$\mu\text{Mol Hexoseeinheiten} \times (\text{gFG})^{-1}$]		
	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Saccharose	214 ± 20	$66,5 \pm 20,0$	$32,6 \pm 6,3$
Stärke	59 ± 8	$20,4 \pm 3,5$	$7,2 \pm 2,3$

In Abb. 1.1 ist der *üblicherweise* untersuchte sechs Tage alte Keimlinge schematisch dargestellt. Die hier verwendeten Keimlinge zeigten jedoch ein verändertes Aussehen. Die Blattfläche der Keimblätter wuchs nur bis zum Tag 4. Das Hypokotyl ließ sich am Tag 6 optisch nicht mehr in drei Teile untergliedern, die Verdickungszone und der Hypokotylhaken fehlten völlig. Die Wurzel waren in ihrer Größe reduziert.

Verblieben die *üblicherweise verwendeten* Keimlinge nach dem sechsten Tagen der Anzucht auf nährstofffreiem Medium, betrug das TG/FG zwischen Tag 8 und Tag 14 durchschnittlich ca. 30 %. Die Konzentrationen der Hexosen waren unabhängig vom Alter bei jeweils ca. 20 mM, die Saccharosekonzentration nahm um nahezu die Hälfte ab. Die vermutete Schwellenkonzentration für Saccharose wurde erreicht, aber nicht unterschritten (Tag 14: 170 mM). Der Stärkegehalt reduzierte sich in diesem Zeitraum bis auf durchschnittlich 140 μMol Hexoseeinheiten $\times (\text{gFG})^{-1}$ am Tag 14 (Tab. 3.2.18). Eine Exsudatnahme war nicht möglich.

Tab. 3.2.18 Saccharose- und Stärkegehalte in den Keimblättern auf nährstofffreiem Medium gezogener Keimlinge. Die Ernte der Keimblätter erfolgte entweder am Tag 8, 10, 12 oder 14. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben ($n \geq 4$).

	Gehalte [μMol Hexoseeinheiten $\times (\text{gFG})^{-1}$]			
	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14
Saccharose	224 ± 37	174 ± 42	129 ± 31	119 ± 40
Stärke	321 ± 42	283 ± 31	211 ± 24	140 ± 36

3.2.9.2 Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter

Um zu klären, ob es in Abhängigkeit vom Alter bzw. Entwicklungszustand der Keimblätter zu einer Akkumulation oder zu einer Mobilisierung bestimmter Substanzen kommt, wurde zunächst das Verhältnis von Trockengewicht zu Frischgewicht unterschiedlich alter Keimblätter ermittelt. Wie schon erwähnt, verringert sich das TG/FG mit dem Ausstrom von Teilchen. Bleibt das TG/FG konstant, müssen sich Wasser- und Teilchenströme kompensieren. Eine Erhöhung des TG/FG kann durch einen übermäßigen Teilchenimport zustande kommen.

Zunächst untersuchte man Pflanzen, die am Tag 6 in eine Klimakammer übertragen und dort bis zum Tag 24 belassen wurden. Das TG/FG veränderte sich nur zwischen Tag 8 und Tag 10 merklich, zeigte ansonsten keine Altersabhängigkeit (Abb. 3.2.14). Die Wasser- und Teilchenströme scheinen sich zu kompensieren. Der Stärkegehalt nahm bei Anzucht in einem Hell-/Dunkelwechselrhythmus von Tag 6 bis zu Tag 14 kontinuierlich zu, um danach wieder bis zum Tag 24 annähernd linear abzusinken. Am Tag 24 war er nur noch halb so hoch wie am Tag 8 (Abb. 3.2.14). Die Konzentration der löslichen Zuckern war bei *guter* Ernährung unabhängig vom Alter der Keimblätter (Abb. 3.2.15). Die Saccharosekonzentration lag bei ca. 400 mM, während die Konzentrationen von Glukose und Fruktose zwischen 10 mM und 35 mM schwankten. Insgesamt gesehen verloren die Keimblättern mit dem Alter an Trockensubstanz (z.B. Stärke).

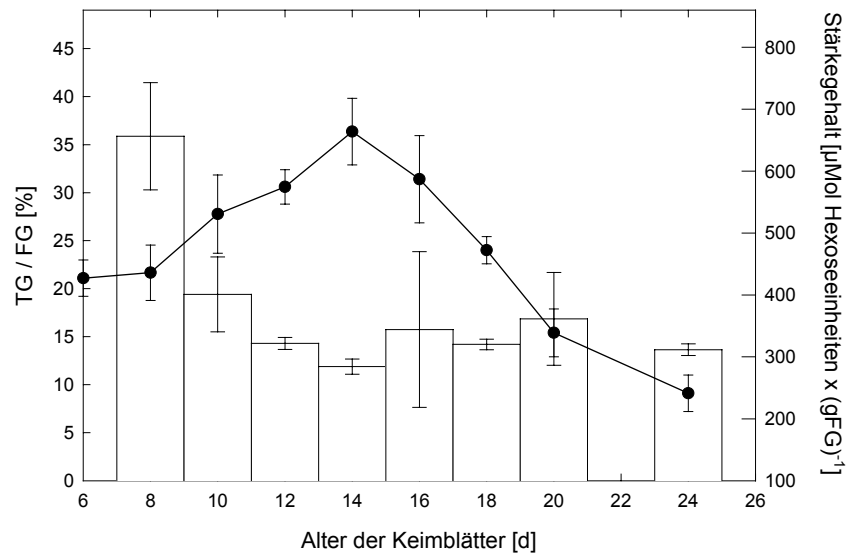


Abb. 3.2.14 Abhängigkeit des Verhältnisses von TG zu FG und des Stärkegehaltes vom Alter der Keimblätter. Die Ricinuspflanzen wurden nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit Nährlösung. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n \geq 9$).

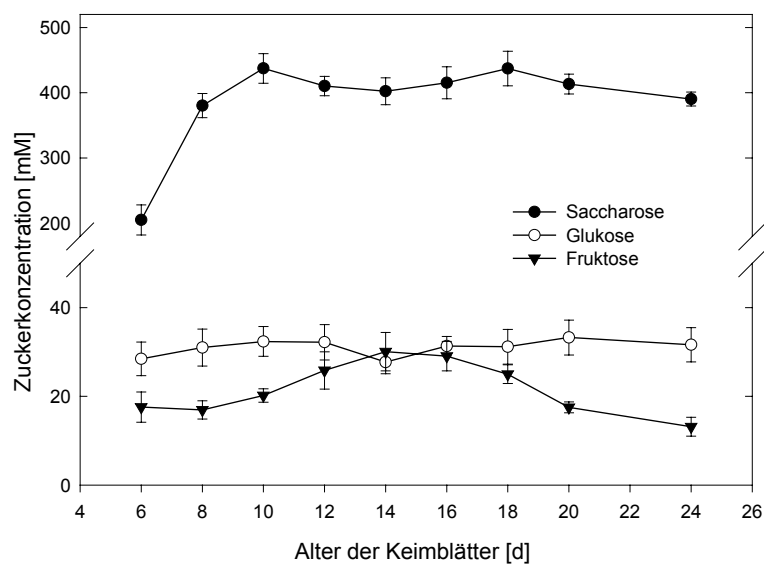


Abb. 3.2.15 Abhängigkeit der Konzentrationen an löslichen Zuckern vom Alter der Keimblätter. Es wurden Ricinuspflanzen untersucht, die nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert wurden. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit Nährlösung. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=6$).

Pflanzen variieren sehr stark in ihren Export-, Assimilationsraten und ihrem Saccharose zu Stärke-Verhältnis (Grodzinski *et al.*, 1998). Innerhalb derselben Art können verschiedene Situationen gefunden werden. Ein Beispiel dafür ist das von Matt *et al.* (1998) beschriebene variable Verhalten von Kurz- und Langtag-Tabakpflanzen. Auch adulte Ricinuspflanzen reagieren sehr vielfältig auf ihre Umwelt- und Wachstumsbedingungen (Grimmer und Komor, 1999). Der Zuckertransport in Pflanzen ist somit ein dynamischer Vorgang, er kann effektiv an veränderte Wachstums- und Umweltbedingungen und tatsächlichen Erfordernisse angepaßt werden.

In den Keimblättern des Ricinuskeimlings werden Zucker in Form von Stärke intrazellulär gespeichert. Auch in einer Zeit in denen die Keimblätter ihre Funktion als Aufnahmeorgan bereits verloren und das Endosperm abgefallen ist, wird immer noch Stärke akkumuliert. Mit dem Alter verlieren die Keimblätter die Fähigkeit Zucker zu speichern, der Stärkepool wird mobilisiert. Die Saccharosekonzentration bleibt parallel dazu konstant. Anders verhält es sich wenn man noch nicht photosynthetisch aktiven Keimlingen die Nährstoffzufuhr entzieht. Setzt man die intrazelluläre Saccharosekonzentration der sechs Tage alten Keimblätter nach Equilibrierung des Blattapoplasten in unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen mit dem Saccharoseefflux aus dem Symplasten in Beziehung, entsteht der Eindruck, daß es eine intrazelluläre Schwellenkonzentration für den Efflux und den Export gibt. Nach Nährstoffentzug existiert auch nach drei Tagen noch ein endogener Saccharose- und Stärkepool, während gleichzeitig kein Nettoexport von Kohlenstoff gefunden werden konnte (auch ältere Keimblätter). Die Phloembelastung aber auch andere Prozesse scheinen streng kontrolliert. Schon seit Jahren ist bekannt, daß Zucker nicht nur zum Kohlenstofftransport *per se* sondern auch als Signal zur Regulation verschiedener Gene dienen (Übersicht in Thomas und Rodriques, 1994; Koch, 1996). Desweiteren wurde schon früh klar, daß auch Hormone an der Regulation des Phloemtransport und damit des Kohlenstoffhaushalts beteiligt sind. Immer häufiger wird von einem Zusammenspiel des *sugar sensings* mit den *N-sensing* diskutiert (Hellmann *et al.*, 2000).

3.2.10 Wechselwirkungen zwischen dem Glutaminstatus der Keimblättern und der Stickstofftranslokation

Sowohl die Glutaminkonzentration in den Keimblättern als auch der Export waren von der externen Glutaminkonzentration abhängig. Auch die intrazelluläre Konzentration wurde durch das apoplastische Angebot beeinflusst und bestimmte ihrerseits den Efflux aus den Parenchymzellen. Extrapoliert man den symplastische Efflux von Glutamin gegen die intrazelluläre Konzentration, schneidet die Kurve die x-Achse annähernd bei Null (Abb. 3.2.16), d.h. der Symplast gibt freies Glutamin unabhängig von seiner eigenen Konzentration in den Apoplasten und aufgrund der bevorzugt apoplastischen Beladung auch ans Phloem ab.

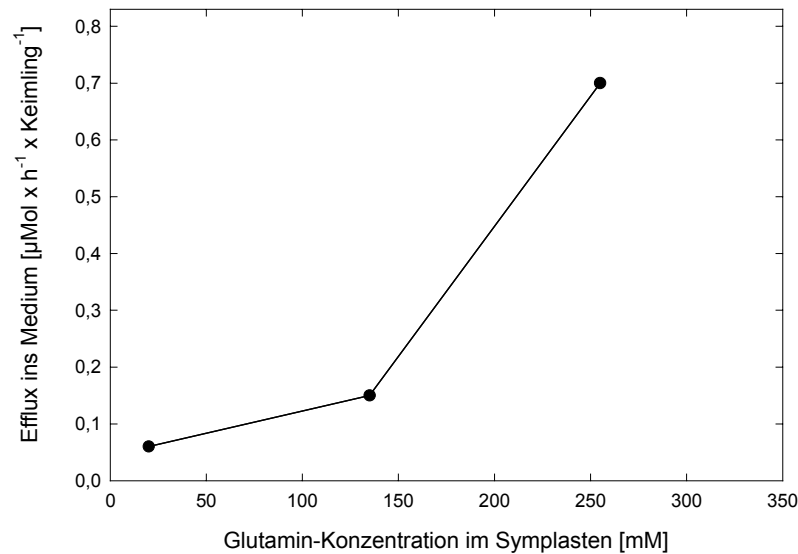


Abb. 3.2.16 Glutaminefflux aus dem Symplasten der Keimblätter von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen inkubiert in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und 3 mM, 10 mM oder 50 mM Glutamin. Die symplastische Konzentration wurde aus dem Glutamingehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

Trotz dieses Befundes wurde untersucht, was geschieht, wenn die Nachlieferung von N-haltigen Verbindungen aus dem apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblättern und dem Endosperm unterbrochen wird.

3.2.10.1 Stickstofftransport nach fehlender apoplastischer Versorgung

Bei der Anzucht in stickstofffreiem Medium ist das Wachstum des Ricinuskeimlings absolut von dem Stickstoff abhängig, der aus dem Endosperm angeliefert wird. Nun wurde den so angezogenen Keimlingen das Endosperm bereits am Tag 3 entfernt. Es wurden die einzelnen Organe sowohl am Tag 3, 4, 5 als auch am Tag 6 analysiert. Eine Exsudatnahme war nicht möglich. Zwischen Tag 3 und 6 nahm die Stickstoffmenge in den Keimblättern kontinuierlich ab, während sie im Hypokotyl und der Wurzel anstieg (Abb. 3.2.17). Der Nettoexport aus den Keimblättern betrug 0,6 bis $1,0 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Die Keimblätter verloren täglich etwa 10 % bis 20 % ihrer N-Menge. Eine Umkehr der Netto-Translokationsrichtung konnte nicht gefunden werden. Auch bei Keimlingen, die bis Tag 14 ohne zusätzliche Nährstoffzufuhr angezogen wurden, gab es keinen Hinweis auf eine untere Schwellenkonzentration für den Glutaminexport (stellvertretend für den N-Export). Die Amino-N-Konzentration (in Aminogruppen gebundener Stickstoff) betrug zu allen Zeiten durchschnittlich 300 mM Amino-Stickstoff.

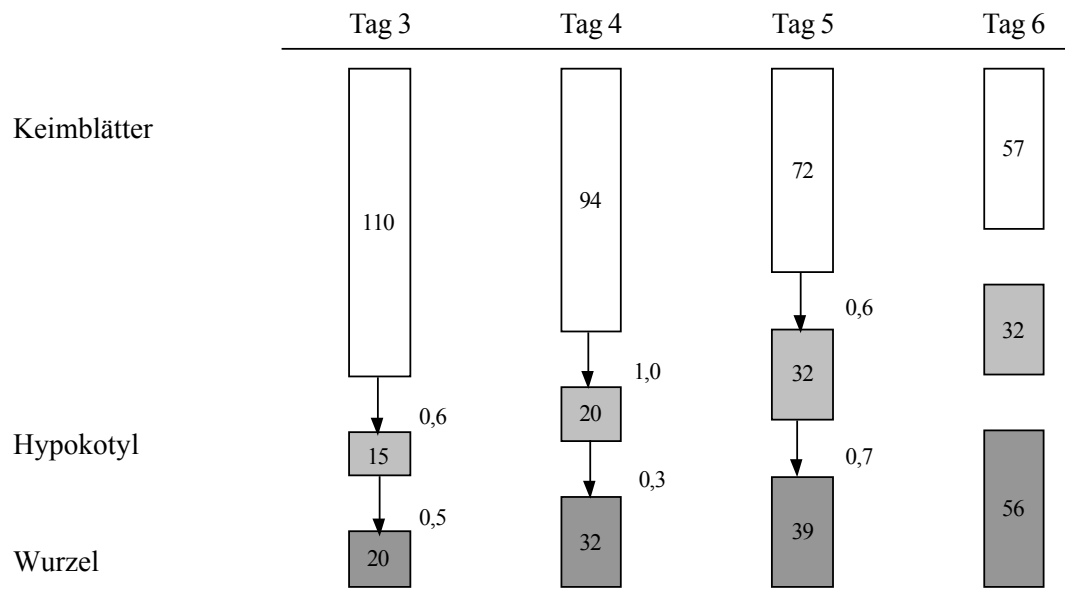


Abb. 3.2.17 Stickstoffmenge [μMol] in den einzelnen Organen von Ricinuskeimlingen nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms. Das Endosperm wurde am Tag 3 entfernt. Die Ernte der Gewebe erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Die Translokationsraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] wurden aus dem Zuwachs der verschiedenen Organe errechnet. Sie sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben ($n \geq 4$).

Tab. 3.2.19 Gehalte der einzelnen Aminosäuren in den Keimblättern von Keimlingen, denen am Tag 3 das Endosperm entfernt wurde. Die Ernte der Proben erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben ($n=4$).

Gehalte der freien Aminosäuren [$\mu\text{Mol} \times \text{Keimblattpaar}^{-1}$]				
Aminosäuren	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
neutral				
asn	$11,3 \pm 0,7$	$11,0 \pm 0,9$	$7,2 \pm 0,5$	$11,7 \pm 0,7$
ser	$7,8 \pm 0,7$	$7,5 \pm 0,5$	$9,1 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,6$
gln	$29,5 \pm 0,8$	$29,6 \pm 1,3$	$21,1 \pm 1,2$	$12,7 \pm 2,6$
gly	$2,2 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,4$
thr	$3,7 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$
ala	$3,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$
tyr	$8,7 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,5$
met	$2,0 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,4$
phe	$3,0 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,4$
ile	$4,2 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,4$
leu	$2,7 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,8$
sauer				
asp	$1,8 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,6$
glu	$11,9 \pm 0,7$	$12,0 \pm 1,0$	$8,7 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,6$
basisch				
arg	$16,6 \pm 0,8$	$17,9 \pm 0,9$	$16,0 \pm 1,2$	$13,4 \pm 0,9$
lys	$1,1 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$
gsh	$6,0 \pm 0,8$	$3,7 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,1$
GABA	$7,1 \pm 0,5$	$7,9 \pm 0,6$	$7,9 \pm 0,8$	$6,6 \pm 0,7$
trp/val	$16,8 \pm 0,2$	$16,7 \pm 0,7$	$16,7 \pm 1,0$	$15,1 \pm 1,4$

3.2.10.2 Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter

Das Endosperm und die Keimblätter sind nur in der ersten Entwicklungsphase einer Pflanze von Bedeutung, sie dienen zunächst als alleiniger *source* für Nährstoffe wie Stickstoff. Die Aufnahme von Stickstoff über die Wurzel, aufgrund der Anzuchtbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.2) in Form von Ammonium und Nitrat, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Das Endosperm wird abgebaut, die Keimblätter altern und fallen ab. Man kann sich die Frage stellen, ob es vor diesem Blattwurf zu einer vollständigen Mobilisierung des N-Pools aus den Keimblättern kommt.

Die Konzentration der *Gesamtheit* der freien Aminosäuren (berechnet als Amino-N) war unabhängig vom Alter der Keimblätter und betrug 300 bis 400 mM. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren zeigten keine signifikanten Tendenzen (vgl. Tab. 3.2.4 und Tab. 3.2.19). Einzig der Nitratgehalt zeigte einen altersabhängigen Verlauf (Abb. 3.2.18). Die Keimblätter scheinen entweder ab Tag 12 mehr Nitrat zu reduzieren, oder weniger Nitrat zu erhalten. Ob dies mit einer Veränderung der Funktion der Keimblätter oder mit der Transpirationsrate (Tanner und Beevers, 1980) verbunden ist, wurde nicht verfolgt. Ein Zusammenhang mit einer Veränderung des Wassereintrags ist wahrscheinlich (siehe Abschnitt 3.2.9.2). Auffällig war, daß dieser Zeitpunkt mit der Abnahme des Stärkegehaltes zusammenfiel. Die Gewinnung von Exsudaten war nicht möglich.

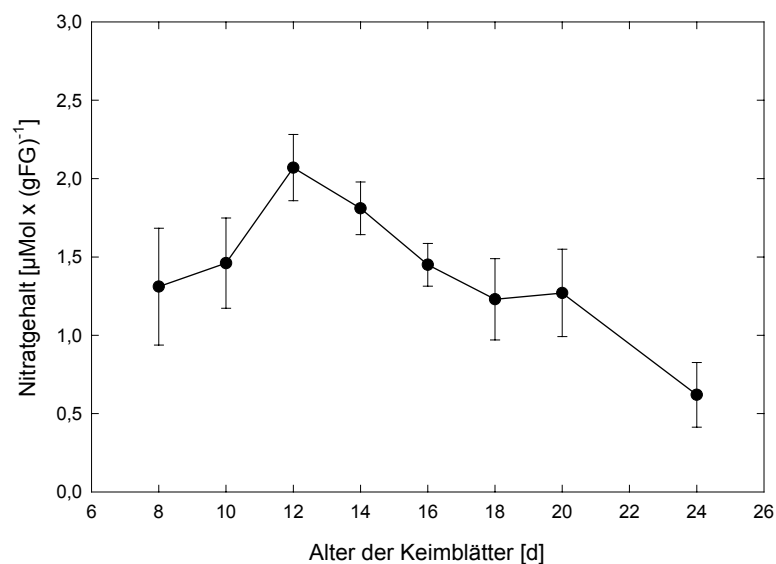


Abb. 3.2.18 Abhängigkeit des Nitratgehalts vom Alter der Keimblätter. Die Ricinuspflanzen wurden nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit ammoniumnitratthaltiger Nährlösung. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=6$).

3.3 Ferntransport von K^+ -Ionen

Obwohl das Element Kalium für alle Pflanzen essentiell ist und meist in weitaus größeren Mengen als die übrigen Kationen und einige Anionen aufgenommen wird, ist es kaum Bestandteil organischer Molekülen. K^+ -Ionen dominieren bei den Kationen im Phloem (Vreughdenhil und Koots-Gronsveld, 1989). Es wird angenommen, daß sie dort eine osmotische Funktion ausüben und zur Kationen/Anionen-Balance dienen (Marschner *et al.*, 1997). Desweiteren ist die hohe Kaliumkonzentration im Phloem für die apoplastische Beladung von Saccharose und einiger Aminosäuren notwendig (Reismeier *et al.*, 1994). Für die Inkubationsversuche wählte man Kaliumchlorid. Chlorid ist in der Natur weit verbreitet. Es ist jedoch, wie Kalium auch, kaum Bestandteil komplexer Moleküle, es ist metabolisch inert.

3.3.1 Elementverteilung in den Keimblättern

Zur Differenzierung des Vorkommens der verschiedenen Substrate in den einzelnen Zellagen der Keimblätter wählte man eine Methode der elektronenmikroskopischen Elementanalyse, die EDX-Analyse (electron dispersive X-ray analysis; Abschnitt 2.8). Durch den Vergleich mit Standards definierter Konzentration konnte der relative Gehalt eines Elementes (im Folgenden einer Konzentration gleichgesetzt) innerhalb des Meßbereichs bestimmt werden. Der Durchmesser der untersuchten Fläche betrug intrazellulär 1 mm oder 250 nm bei den Messungen im extrazellulären Bereich, die Position der Meßpunkte im Blattquerschnitt ist jeweils angegeben. Den einzelnen Zahlenwerten liegen mindestens 3 Messungen pro Meßpunkt an zwei unterschiedlichen Keimblättern zugrunde. Die Standardabweichung betrug in allen Fällen maximal 35%.

Verteilung von Kalium und Chlor in den Keimblättern

Zunächst wurde die zelluläre und subzelluläre Verteilung von Kalium und Chlor in den Keimblättern von Keimlingen mit Endosperm verfolgt. Der intrazelluläre Kaliumgehalt pro Meßpunkt (gewonnen durch den Vergleich mit einem Standard definierter Konzentration) war im Vergleich zum Gesamtgehalt der Keimblätter deutlich vermindert und ortsabhängig (Abb. 3.3.1 und Abb. 3.3.2; Zhong *et al.*, 1998). Ein Maximum ergab sich für die Zellen des Xylemparenchyms, ein Minimum im Schwammparenchym. An Orten mit hohem symplastischen Gehalt war der angrenzende apoplastische gering und umgekehrt. Auffällig erschienen schwarze Körper, die üblicherweise ca. 80 mM, aber durchaus bis zu 1500 mM Kalium enthielten. Eine Kontrastierung wird durch eine hohe Elementdichte hervorgerufen. Dementsprechend dunkel erscheinende Körper (schwarze Körper) werden im Folgenden als Einschlußkörper bezeichnet. Der relative intrazelluläre Chlorgehalt waren mit 4 bis 14 mM deutlich geringer als der Kaliumgehalt, der extrazelluläre hoch (20-77 mM). Die Maxima ergaben sich in den beiden Epidermen. Dieser Befund steht im Einklang mit anderen Studien (z.B. Dietz *et al.*, 1992). Auch in den Plastiden fand man Spuren von Chlor, nicht aber in den Einschlußkörpern. Chlor ist in den Ricinuskeimblättern zu 90 % wasserextrahierbar (Zhong *et al.*, 1998).

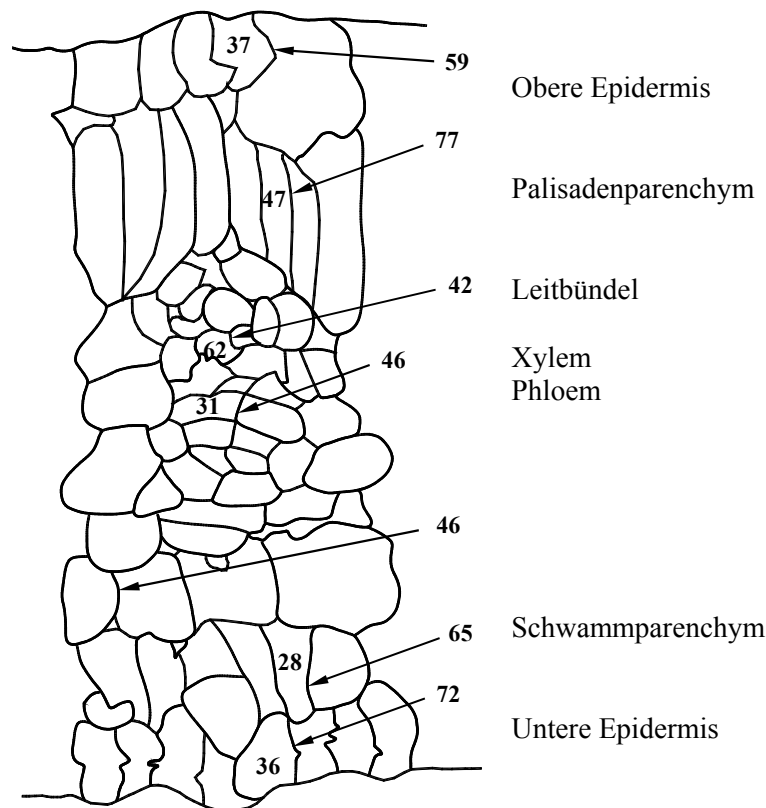


Abb. 3.3.1 Kaliumverteilung in den Keimblättern von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen mit Endosperm. Illustration der Meßpunkte im Querschnitt. Die Quantifizierung erfolgte anhand von EDX-Analysen. Die Zahlenwerte geben den relativen Gehalt, gewonnen durch den Vergleich mit Standards definierter Konzentration (mM), im jeweiligen Meßbereich an.

3.3.2 Kaliumtransport nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten

Experimente von Komor *et al.* (1989) und Zhong (1994) lassen vermuten, daß unter *in vivo*-Bedingungen die freie Kaliumkonzentration im apoplastischen Raum zwischen den Keimblättern und dem Endosperm einen Wert von ca. 1 mM Kalium erreicht. Für die Inkubationsversuche wählte man deshalb 0,3 mM, 1 mM und 10 mM Kaliumchlorid. Die künstliche Apoplastenlösung wurde in diesem Fall nicht mit MES-Puffer versetzt, da dieser normalerweise mit KOH auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt wurde und somit 1,5 mM Kalium enthielt. Eine Zugabe von NaOH zur Einstellung des pH-Wertes verringerte die Volumenflußrate im Phloems stark (auf bis zu $5 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$). Dieser Effekt bestätigte Messungen von Kallarackal *et al.* (1989). NMR-Messungen ergaben jedoch eine *in vivo*-Volumenflußrate von ca. $17 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Um dieser Situation möglichst nahe zu kommen, wurde letztendlich ein Medium aus Saccharose, CaCl_2 und KCl verwendet, da festgestellt wurde, daß die Pufferkapazität der Keimblätter ausreicht, den pH-Wert der künstlichen Apoplastenlösung auf 5,5 einzustellen.

3.3.2.1 Gehalt in den Keimblättern und Konzentration im Siebröhrenexsudat

Der Kaliumgehalt in den Keimblättern betrug bei Keimlingen mit Endosperm ca. $110 \mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$. Er veränderte sich weder nach Transfer in 0,3 mM noch in 1 mM Kaliumchlorid deutlich. Nur 10 mM Kalium führte bereits nach 2stündiger Inkubation zu einem höheren, neuen *steady state*-Niveau (Abb. 3.3.2). Die Konzentration des freien Chlorids war im Vergleich zum Kaliumgehalt sehr gering, in einer Größenordnung von 10 bis 20 mM. Nur bei einer apoplastischen Konzentration von 10 mM Chlorid wurde die Konzentration der Keimlinge mit Endosperm (ca. 20 mM) übertroffen. Man ging im Folgenden für Kalium von einer Equilibrierungszeit von 8 Stunden aus.

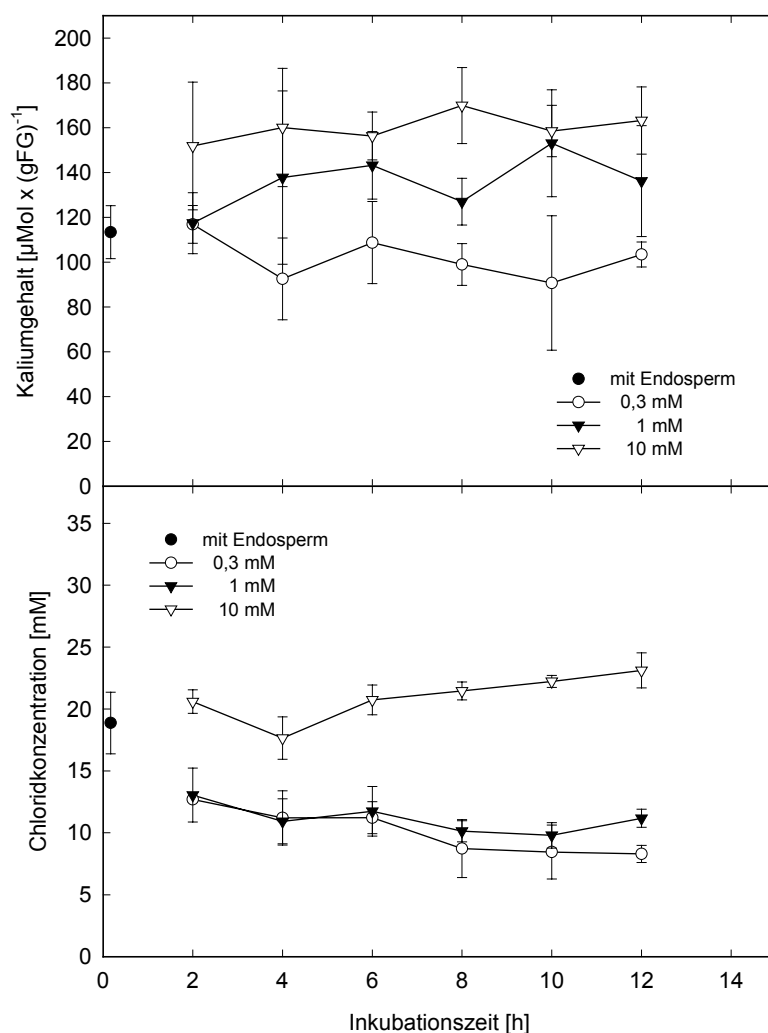


Abb. 3.3.2 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Kalium und Chlorid in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl_2 und KCl in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Die Chloridkonzentration in den Keimblättern wurde aus dem Chloridgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Kalium ist das dominante Kation im Siebröhrenexsudat. Schon Zhong (1994) und Köckenberger (1995) fanden Hinweise darauf, daß Kalium im Ricinuskeimling zwischen Phloem und Xylem zirkuliert. Zur Quantifizierung dieser Zirkulation in Abhängigkeit vom externen Angebot wurde zunächst Siebröhrenexsudat gewonnen (Abb. 3.3.3). Bei allen apoplastischen Bedingungen waren die Unterschiede zur Kaliumkonzentration des Mediums hoch, im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm gering. Auffällig war, daß die Konzentration im Siebröhrenexsudat derjenigen im Apoplasten nahe des Phloems entsprach (Abb. 3.3.1).

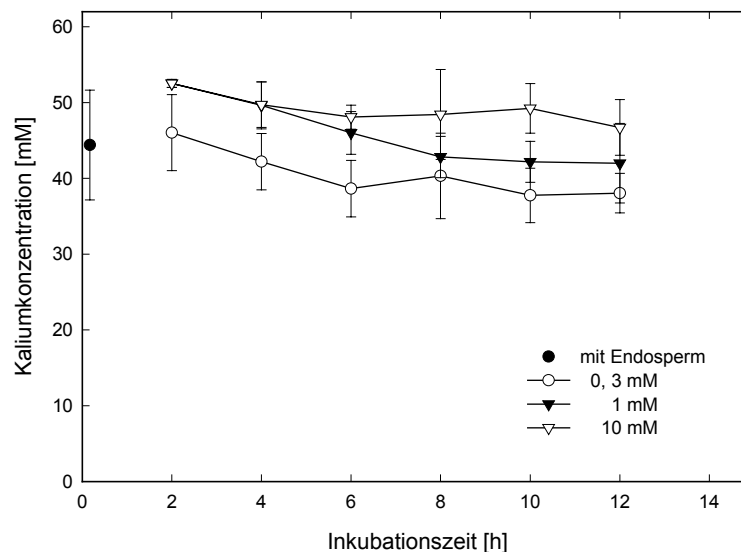


Abb. 3.3.3 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Kalium im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl_2 und Kaliumchlorid in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 30 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

3.3.2.2 Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem

Verfolgt man den Weg der Kalium-Ionen vom apoplastischen Raum zwischen dem Endosperm und den Keimblättern, in die Keimblätter und auf dem weiteren Wege ins Phloem, kann man feststellen, daß es zu einer Anreicherung von Kalium zwischen den Keimblättern und dem Medium (künstliche Apoplastenlösung) aber auch zwischen dem Phloem und dem Medium kam (Abb. 3.3.4). Sowohl der Akkumulationsfaktor zwischen Keimblätter und Medium und der zwischen dem Phloem und dem Medium nahm rapide ab (Tab. 3.3.1). Geht man von 1 mM freiem Kalium im apoplastischen Raum zwischen den Keimblättern und dem Endosperm aus, zeigte sich zum Apoplasten der unteren Epidermis bereits einen ca. 70 %igen Anstieg.

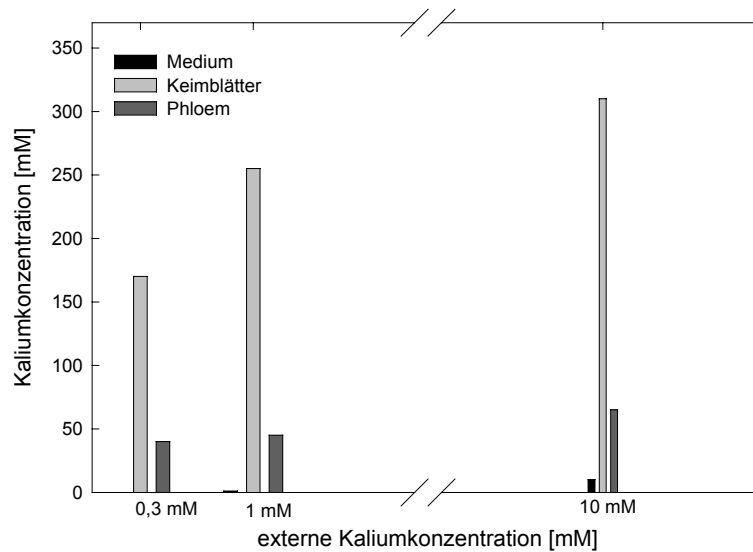


Abb. 3.3.4 Vergleich der *steady state*-Konzentrationen im Medium (künstliche Apoplastenlösung), in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter in 0,3 mM, 1 mM und 10 mM Kalium. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Kaliumgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

Tab. 3.3.1 Akkumulationsfaktoren unter *steady state*-Bedingungen für Kalium zwischen dem Medium (künstliche Apoplastenlösung), den Keimblättern und dem Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter an intakten Keimlingen in 0,3 mM, 1,0 mM oder 10 mM Kalium. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Kaliumgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

externe Bedingungen	Keimblätter	Siebröhrenexsudat
	Medium	Medium
0,3 mM Kalium	567	133
1 mM Kalium	255	45
10 mM Kalium	31	7

3.3.2.3 Kaliumaufnahme aus dem apoplastischen Raum und symplastischer Efflux

Die Kaliumaufnahme aus dem apoplastischen Raum in die Keimblätter wurde anhand der Veränderung des Isotopenverhältnisse ^{39}K zu ^{41}K im Inkubationsmedium und der *Verarmung* des Mediums bestimmt. Man ging von einer gleichberechtigten Aufnahme beider Isotope aus. Verwendet wurde ^{41}K Kaliumchlorid. Die Aufnahmeraten zeigten nur eine geringe Abhängigkeit von der apoplastischen Konzentration und lagen zwischen $0,8$ und $1,1 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Über die Aufnahme in den Parenchymzellen der Keimblätter ist nichts bekannt. Für die Saccharosebeladung des Phloem ist gefordert, daß die apoplastische Konzentration zumindest im Bereich des Mesophylls gesteigert und in den Zellwänden des Phloems reduziert ist (Schobert *et al.* 1998). Die apoplastische Konzentration wird auch durch den Efflux von Kalium aus den Parenchymzellen bestimmt. Tatsächlich kam es bei 10 mM externem Kalium zu einem Efflux von $0,1$ bis $0,3 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Bei der geringen und der mittleren apoplastischen Kaliumkonzentration wurde jedoch kein symplastischer Efflux gefunden. Möglicherweise sind K^{+} -

Ionen fest an apoplastische Strukturen assoziiert, sie können dann durch diese Methode nicht erfaßt werden.

3.3.2.4 Kalium-Massenflußraten in Phloem und Xylem

Keimlinge mit Endosperm enthielten in ihrem Wurzeldruckexsudat $11,40 \pm 1,02$ mM Kalium. Inkubierte man die Keimlinge mit ihren Keimblättern in 0,3 mM, 1 mM und 10 mM Kalium sank die Konzentration in allen Fällen ab. Es stellt sich jeweils eine neue distinkte Kaliumkonzentration ein, d.h. es erfolgte eine Zirkulation von Kalium in Abhängigkeit von der apoplastischen Konzentration. Die Konzentration der Keimlinge mit Endosperm wurde jedoch auch bei der hohen apoplastischen Konzentration von 10 mM nicht erreicht (Abb. 3.3.5).

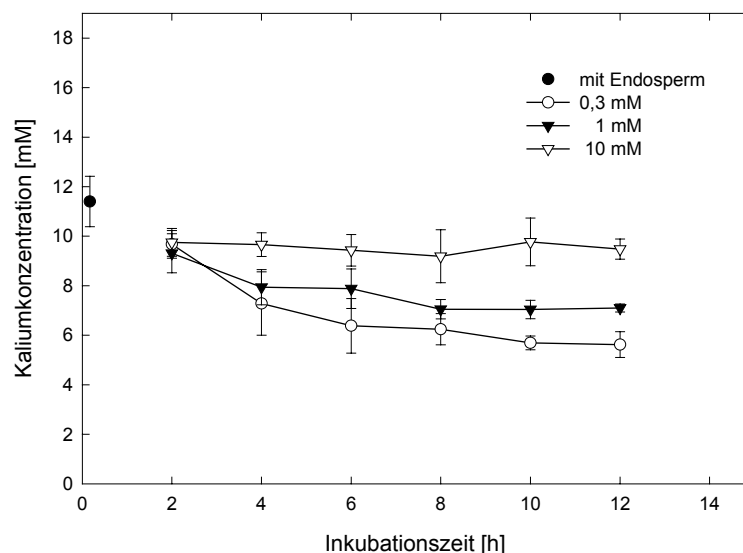


Abb. 3.3.5 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Kalium im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl_2 und Kalium in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 15 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Der Volumenfluß im Xylem schwankte unabhängig von den Inkubationsbedingungen zwischen 40 und $50 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Im Phloem zeigte sich eine Beeinflussung durch das externe Kaliumangebot. Bei 0,3 mM Kalium wurden ca. $15 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ bei 10 mM K^+ durchschnittlich nur noch $9 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ gemessen. In Tab. 3.3.2 ist die Abhängigkeit der Kaliummassenflüsse vom externen Angebot dargestellt. Das System arbeitet schon bei niedriger apoplastischer Konzentration nahe der Substratsättigung für die Phloembeladung. 50 bis 80 % des aus den Keimblättern exportierten Kaliums zirkulieren zwischen Phloem und Xylem, d.h. 50 % und mehr kehren in den Keimblattapoplasten zurück.

Tab. 3.3.2 *Steady state*-Massenflußraten für Kalium in Phloem und Xylem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl₂ und Kaliumchlorid in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Kalium-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Phloem	Xylem
0,3 mM Kalium	0,48 \pm 0,025	0,27 \pm 0,001
1 mM Kalium	0,49 \pm 0,043	0,33 \pm 0,003
10 mM Kalium	0,53 \pm 0,003	0,45 \pm 0,080

Nach Etablierung der neuen *steady state*-Situation in 0,3 mM und 1 mM externem Kalium wurden die Bedingungen im *source* im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm kaum verändert, vieles spricht daher für eine Konzentration von ca. 1 mM freiem Kalium im apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm. Im *sink* wurde die *in vivo*-Situation auch bei 10 mM Kalium in der künstlichen Apoplastenlösung nicht erreicht. Möglicherweise wird die Kaliumfestlegung durch das Vorhandensein / Fehlen anderer Stoffe (außer Saccharose) beeinflusst.

3.3.3 Kaliumtransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Kalium über den Wurzelapoplasten angeboten. Im Mittelpunkt stand die Frage, bei welcher Flüssen über das Xylem die Situation mit den über den Keimblattapoplasten equilibrierten Keimlingen erreicht wird. Die Keimblätter waren in einer Lösung aus 100 mM Saccharose und 0,2 mM CaCl₂ inkubiert. Die Kaliumkonzentrationen im Wurzelmedium betrugen zunächst 0,1 mM bzw. 0,3 mM, 1 mM oder 10 mM, zusätzlich wurden auch 0,01 und 0,03 mM Kaliumchlorid eingesetzt.

3.3.3.1 Kaliumtransport im Xylem und Import in die Keimblätter

Nach Transfer in 0,1 mM Kalium war die Kaliumkonzentration im Wurzeldruckexsudat mit derjenigen der Keimlinge mit Endosperm vergleichbar. Die Auswirkungen von 0,3 mM und 1 mM Kalium unterschieden sich nicht. Nur 10 mM Kaliumchlorid ließ die Konzentration noch einmal ansteigen (Abb. 3.3.6). Sie war somit in allen Fällen im Vergleich zur Equilibrierung über die Keimblätter erhöht.

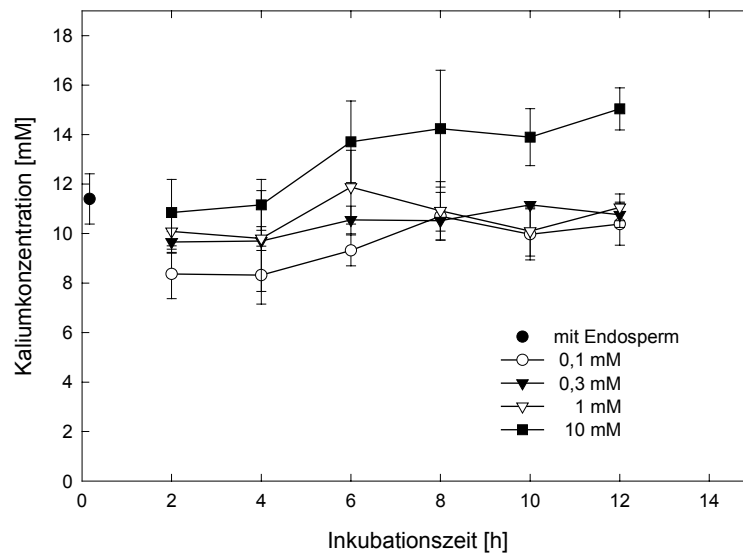


Abb. 3.3.6 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Kalium im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 0,5 mM CaCl_2 und Kalium in den angegebenen Konzentrationen. Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 5,0 eingestellt. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 30 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Nach Transfer in 10 mM Kaliumchlorid kam es parallel zum Anstieg des Imports in die Keimblätter, auch zu einem leichten Anstieg des Kaliumgehaltes dort (Abb. 3.3.7). Auffällig war, daß die Kaliumkonzentration im Siebröhrenexsudat relativ unabhängig vom Angebot an der Wurzel war. Sie entsprach derjenigen nach Equilibrierung über die Keimblätter und auch der mit Endosperm exsudierender Keimlinge. Die Keimblätter akkumulierten folglich bei übermäßiger Versorgung im geringen Ausmaß Kalium. Dieser Befund kann jedoch nicht allein durch die Beladung mit Kalium hervorgerufen werden sondern auch von den jeweils gleichen Saccharoseflüssen abhängen. Die externe Saccharosekonzentration an den Keimblättern betrug in allen Fällen 100 mM Saccharose. Saccharose und Kalium interagieren bei der Phloembeladung (Riesmeier *et al.*, 1994).

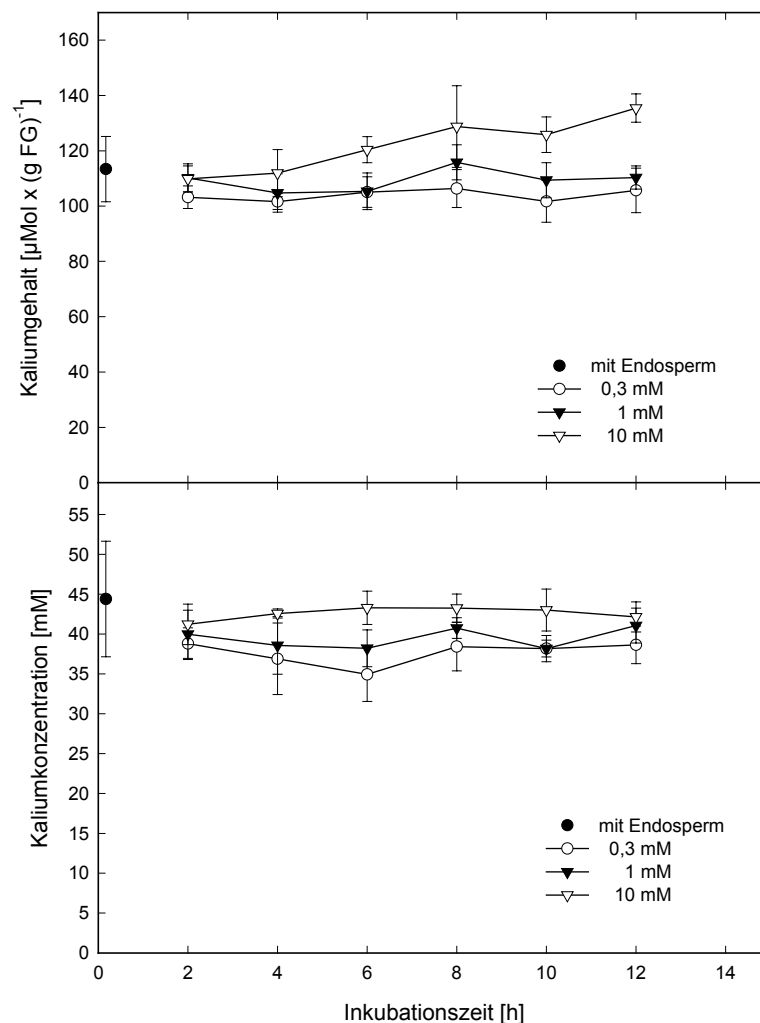


Abb. 3.3.7 Etablierung der *steady state*-Situation für die Kaliumgehalte in den Keimblättern und Konzentrationen im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 0,5 mM CaCl_2 und Kalium in den angegebenen Konzentrationen. Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 5,0 eingestellt. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 20 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

3.3.3.2 Kaliumtransport nach Angebot von Konzentrationen typischer Standorte

Die bislang im Wurzelmedium eingesetzten Konzentrationen waren, um der Equilibrierung über den Keimblattapoplasten vergleichbare Verhältnisse vorzufinden, hoch. Die jeweils erzielten Flüsse unterschieden sich kaum. Nun wurden die Konzentrationen im Wurzelmedium so gewählt, daß sie derjenigen der Bodenlösung typischer Standorte entsprachen. Im Boden kommen bis zu 100 μM Kalium vor (Scheffer und Schachtschabel, 1989). Mit dieser Versuchen sollte somit die apoplastische Konzentration im Bereich des Phloems *deutlicher* manipuliert und die Auswirkungen quantifiziert werden.

Die Kaliumkonzentration im Wurzeldruckexsudat sank durch das reduzierte Kaliumangebot deutlich ab, unabhängig davon ob man die Keimlinge mit Endosperm oder die bisherigen Inkubationsbedingungen als Vergleichmaßstab heranzieht. Pro Zeiteinheit wurde weniger Kalium in die Keimblätter importiert (Abb. 3.3.8).

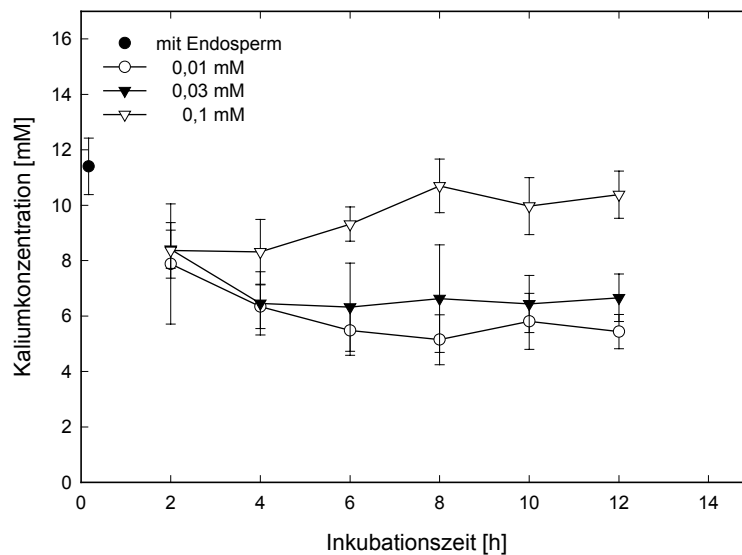


Abb. 3.3.8 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Kalium im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 0,5 mM CaCl_2 und Kalium in den angegebenen Konzentrationen. Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 5,0 eingestellt. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 30 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Dieser verringerte Import zeigte Auswirkungen in den Keimblättern (Tab. 3.3.3). Ein deutlicher Effekt zeigte sich auch bei der Kaliumkonzentration im Siebröhrenexsudat. Sie betrug bei 0,01 mM und 0,03 mM Kalium nur noch 26 mM bis 28 mM, 0,1 mM ergaben ca. 40 mM Kalium. Nach Inkubation über die Wurzel schwankten die Volumenflußraten des Xylems zwischen 30 bis 50 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$, die des Phloems zwischen 10 und 18 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$.

Tab. 3.3.3 *Steady state*-Konzentrationen für Kalium in den Keimblättern und im Phloem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 0,01 mM und 0,03 mM Kaliumchlorid und 0,5 mM CaCl_2 . Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 5,0 eingestellt. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl_2 ein. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Exsudationszeit betrug 40 min. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Gehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Kalium-Konzentrationen [mM]	
	Keimblätter	Phloem
mit Endosperm	206 ± 21	44 ± 7
0,01 mM Kalium	153 ± 13	26 ± 8
0,03 mM Kalium	192 ± 3	28 ± 5

Auch die Kaliumflußraten (Tab. 3.3.4) in den beiden Leitbahnen zeigten, wie die Konzentrationen, eine eindeutige Abhängigkeit vom Angebot. Die Differenz Xylem- zu Phloemtransport nahm mit ansteigender Kaliumkonzentration im Wurzelmedium immer mehr zu. Es wurde prozentual weniger des in die Keimblätter importierten Kaliums wieder exportiert. Der Phloemfluß scheint auch hier eine Rate von $0,55 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ nicht überschreiten zu können (vgl. Inkubation über die Keimblätter).

Tab. 3.3.4 *Steady state*-Massenflußraten für Kalium im Xylem und Phloem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 0,5 mM CaCl_2 und Kaliumchlorid in den angegebenen Konzentrationen. Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 5,0 eingestellt. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose und 0,2 mM CaCl_2 ein. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben.

externe Bedingungen	Kalium-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Xylem	Phloem
0,01 mM Kalium	0,310	0,400
0,03 mM Kalium	0,430	0,420
0,1 mM Kalium	0,490	0,470
0,3 mM Kalium	0,510	0,470
1 mM Kalium	0,520	0,490
10 mM Kalium	0,740	0,550

3.3.4 Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.3.5) sind die nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten und nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten erzielten Massenflüsse in Phloem und Xylem einander gegenübergestellt.

Tab. 3.3.5 Vergleich der *steady state*-Massenflüsse von Kalium nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten oder über den Wurzelapoplasten.

externe Bedingungen	Equilibrierung über Keimblätter	Equilibrierung über Wurzel
	Phloem	Phloem
0,3 mM K ⁺	0,48 ± 0,025	0,47 ± 0,03
1 mM K ⁺	0,49 ± 0,003	0,49 ± 0,03
10 mM K ⁺	0,53 ± 0,003	0,55 ± 0,04
	Xylem	Xylem
0,3 mM K ⁺	0,27 ± 0,001	0,51 ± 0,02
1 mM K ⁺	0,33 ± 0,003	0,52 ± 0,01
10 mM K ⁺	0,45 ± 0,080	0,74 ± 0,10

3.3.5 Kaliumverteilung im Hypokotyl

Bestimmte man den Kaliumgehalt entlang des Hypokotyls, zeigte sich das Maximum am Apex (Abb. 3.3.9). Im Bereich der Verdickungszone war der Kaliumgehalt bereits abgesunken, im basalen Hypokotyl gering. Dies traf nicht nur auf sechs sondern auch auf sieben Tage alte Keimlinge zu. Die höchste Kaliumentladung des Phloems ist somit im apikalen Hypokotyl zu erwarten (siehe Abschnitt 3.2.6). Der durch Wuchsanalyse ermittelte Export beträgt in diesem Alter $0,34 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ (Zhong, 1994; Tab. 1 Anhang). Nach Manipulation der Apoplastenlösung lagen die Phloemflüsse zwischen 0,48 und 0,53 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$, die im Xylem zwischen ca. 0,27 und 0,45 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Die geforderte Netto-Translokationsrate wurde unterschritten. Dies ist eine weitere Bestätigung, daß ein Großteil der Kalium-Ionen bereits im apikalen Hypokotyl wieder aus dem Phloem entladen werden.

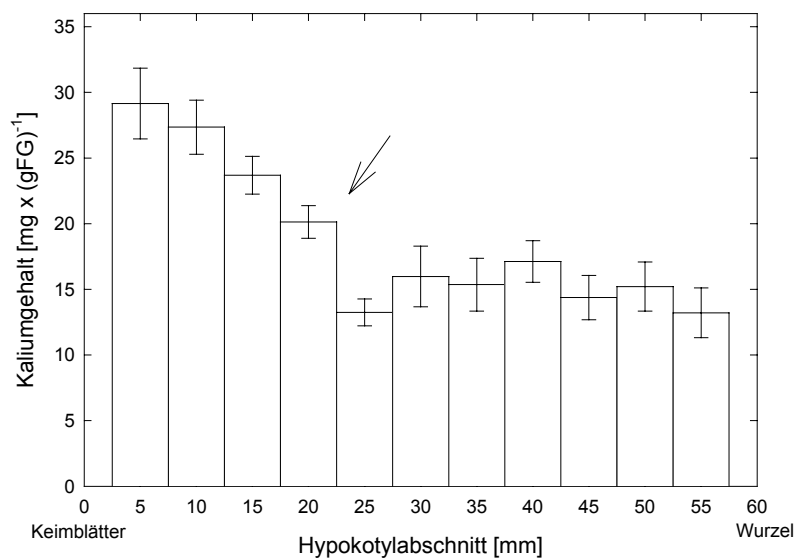


Abb. 3.3.9 Kaliumverteilung entlang des Hypokotyls von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen. Es wurden 5 mm lange Hypokotylabschnitte zur Bestimmung herangezogen. Die Lage der Verdickungszone ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=6$).

3.3.6 Wechselwirkungen zwischen der Kaliumkonzentration in den Keimblättern und der Kaliumtranslokationsrate

Die Kaliumbeladung des Phloems, die auf apoplastischem Wege erfolgt (Zhong *et al.*, 1998) ist bereits bei relativ geringen Konzentrationen gesättigt, d.h. maximal. Es existiert aber auch eine vermeintliche untere Schwellenkonzentration für die Phloembeladung. Gleiches wurde schon für Saccharose beschrieben (Abschnitt 3.2.9), trifft aber nicht auf die freien Aminosäuren (zumindest auf Glutamin) zu (Abschnitt 3.2.10). Unter einer intrazellulären Konzentration von ca. 250 mM Kalium sollte der Efflux und auch der symplastische und der indirekt apoplastische Export zum Erliegen kommen. Der Phloemfluß würde nur noch aus dem Apoplasten gespeist. Wenn zusätzlich externes Kalium ausbleibt, ist es leicht vorstellbar, daß der Export völlig ausbleibt. Um dieses Nachprüfen zu können, wurde zunächst der Kaliumtransport in Keimlingen nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms untersucht.

3.3.6.1 Kaliumtransport nach fehlender apoplastischer Versorgung

Für diese Versuchsreihe entfernte man das Endosperm am Tag 3 (Abb. 3.3.10). Die Keimlinge wurden entweder gleich geerntet oder bis zum Tag 4, Tag 5 oder 6 angezogen. Bestimmt wurde die Kaliummenge in den einzelnen Organen. Aus dem Zuwachs oder Verlust errechnete man die Translokationsraten, zur besseren Vergleichbarkeit bezogen auf eine Stunde. Eine Exsudatgewinnung war in diesem frühen Alter nicht möglich.

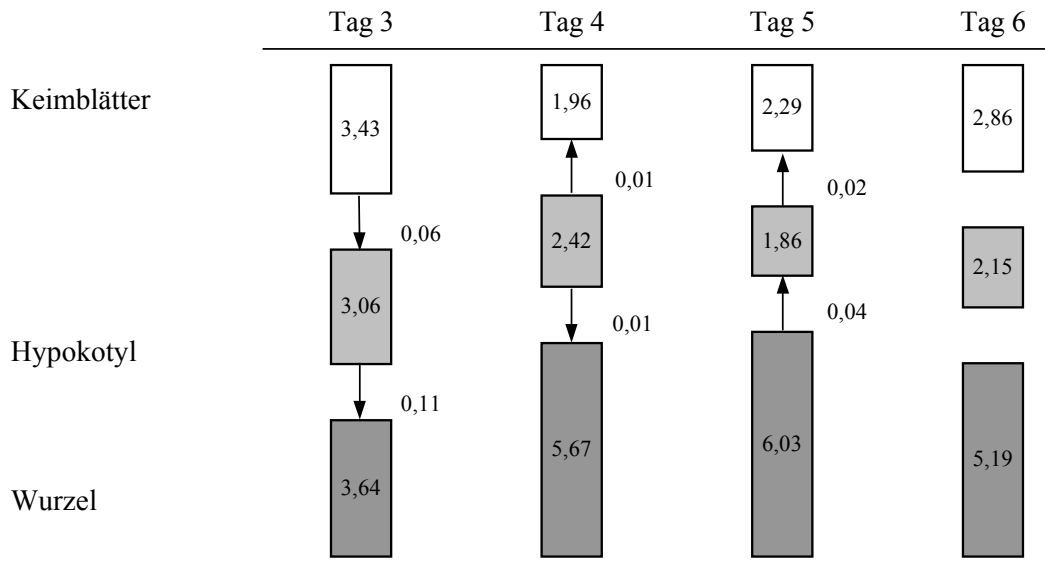


Abb. 3.3.10 Kaliummenge [μMol] in den einzelnen Organen von Ricinuskeimlingen nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms. Das Endosperm wurde am Tag 3 entfernt. Die Ernte der Gewebe erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Die Translokationsraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] wurden aus dem Zuwachs der verschiedenen Organe errechnet. Sie sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben ($n \geq 4$).

Trotz fehlender Nährstoffzufuhr verloren die Keimblätter zunächst netto Kalium. Zwischen Tag 4 und Tag 5 erkannte man keine Haupttransportrichtung. Die Keimblätter zeigten kein Wachstum mehr, auch der Kohlenstoffexport war gestört (Abschnitt 3.2.9). Nachfolgend war die Netto-Transportrichtung wieder eindeutig. Die Wurzel verlor, das Hypokotyl und v.a. die Keimblätter gewannen an Kalium. Obwohl die Kaliummenge in den Keimblättern anscheinend kaum abnahm, reduzierte sich die Kaliumkonzentration (380 mM an Tag 3, berechnet aus dem Kaliumgehalt und dem Wasseranteil) in diesem Zeitraum um den Faktor 10. Die vermutete untere Schwellenkonzentration von 250 mM wurde bereits am Tag 4 unterschritten (56 mM an Tag 4; 38 mM an Tag 5). Interessanterweise zeigten auch ältere Keimlinge, die nur mit CaCl_2 -Lösung über die Wurzel versorgt wurden, einen leichten Anstieg des Kaliumgehaltes ihrer Keimblätter und zwar von $160 \mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$ (Tag 8) auf $210 \mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$ am Tag 14.

3.3.6.2 Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter

Es hat sich gezeigt, daß die Kaliumkonzentration in den Keimblättern bei übermäßigem Kaliumangebot im Apoplasten zunimmt. Die Phloembeladung ist schon bei niedriger apoplastischer Konzentration gesättigt, außerdem gibt es bei fehlender apoplastischer Zufuhr eine untere Schwellenkonzentration für den Export. Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Situation während der Alterung der Keimblätter verändert. Hierzu untersuchte man Keimblätter bei *guter* Nährstoffversorgung. Die Keimblätter wuchsen bis zum Tag 12 bzw. 14 in ihrer Größe an, dies war gekoppelt mit einem Anstieg des Kaliumgehaltes. Zwischen Tag 12 und Tag 14 kam es, wie schon für Kohlenstoff und Stickstoff festgestellt, zu einer entscheidenden Veränderung. Der Kaliumgehalt blieb von nun an konstant bzw. nahm leicht ab. In Abb. 3.3.11 ist der Kaliumgehalt

dieser Keimblätter zusammen mit dem Saccharosegehalt (Abschnitt. 3.2.9) dargestellt. Zur Diskussion steht die Interaktion von Kalium und Saccharose bei der Phloembeladung.

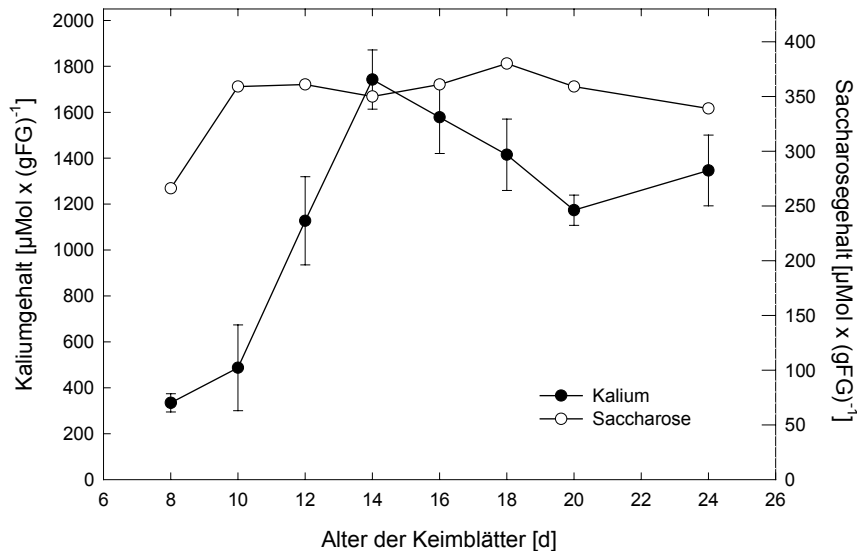


Abb. 3.3.11 Abhängigkeit des Kaliumgehaltes vom Alter der Keimblätter. Die Ricinuspflanzen wurden nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit kaliumhaltigem Nährlösung. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

3.3.7 Magnesium und Calcium

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in allen Fällen auf Anzuchtstöpfen oder Vermiculit mit einer 0,5 mM Calciumchloridlösung im Wurzelraum. Ohne diese Lösung an der Wurzel stellten die Keimlinge ihr Wachstum zwischen Tag 3 und 4 ein. Dieser Effekt scheint ausschließlich durch Calcium-Ionen bedingt zu sein, da schon Zhong (1994) zeigen konnte, daß Chlorid-Ionen keinen merklichen Einfluß auf die Verhältnisse im Keimling haben.

Verteilung der beiden Elemente in den Keimblättern

Der cytoplasmatische Magnesiumgehalt fiel geringer aus als nach Analyse der gesamten Keimblätter (ca. $93,3 \mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$; Zhong *et al.*, 1993) erwartet werden konnte (Abb. 3.3.12). Der extrazelluläre Gehalt war meist leicht höher als der korrespondierende intrazelluläre. Besonders auffällig war der hohe cytoplasmatische und extrazelluläre Gehalt in der oberen Epidermis. Sogar auf der Außenseite der oberen Epidermis wurde Magnesium und auch Calcium gefunden. Der hohe Gesamtgehalt in den Keimblättern wurde durch das Vorkommen von Einschlusskörpern bedingt. Ihre Verteilung korreliert mit den P-haltigen Körpern, bei denen es sich vermutlich um Phytin handelt (Abschnitt 3.4.1). Der apoplastischen Calciumgehalt war mit

Ausnahme der Wände des Palisadenparenchyms hoch (ca. 110 mM), die intrazelluläre Konzentration mit 3 bis 5 mM gering. Karley *et al.* (2000) sprechen davon, daß Calcium v.a. in den Epidermen akkumuliert wird. Mittels EELS-ESI-Messungen konnten auch in den Ricinuskeimblättern calciumhaltige Einschlüsse in der unteren Epidermis der Keimblätter nachgewiesen werden. Die Messung erfolgte in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Bayreuth durch G. Acker mittels der dort etablierten Methoden und Geräte (nach Franz, 1994).

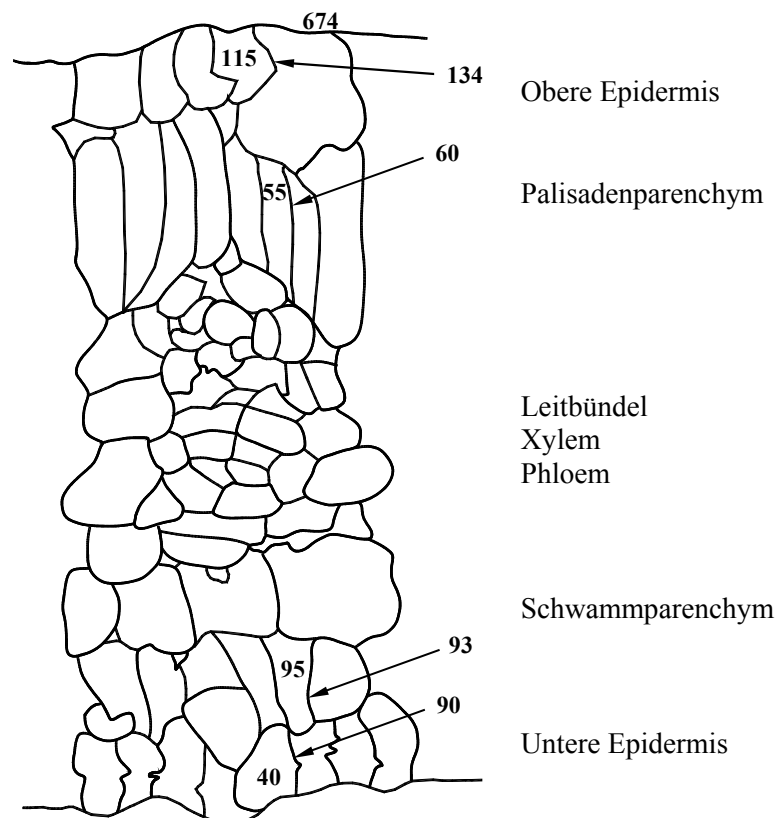


Abb. 3.3.12 Magnesiumverteilung in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen mit Endosperm. Illustration der Meßpunkte im Querschnitt. Die Quantifizierung erfolgte anhand von EDX-Analysen. Die Zahlenwerte geben den relativen Gehalt, gewonnen durch den Vergleich mit Standards definierter Konzentrationen (mM), im jeweiligen Meßbereich an.

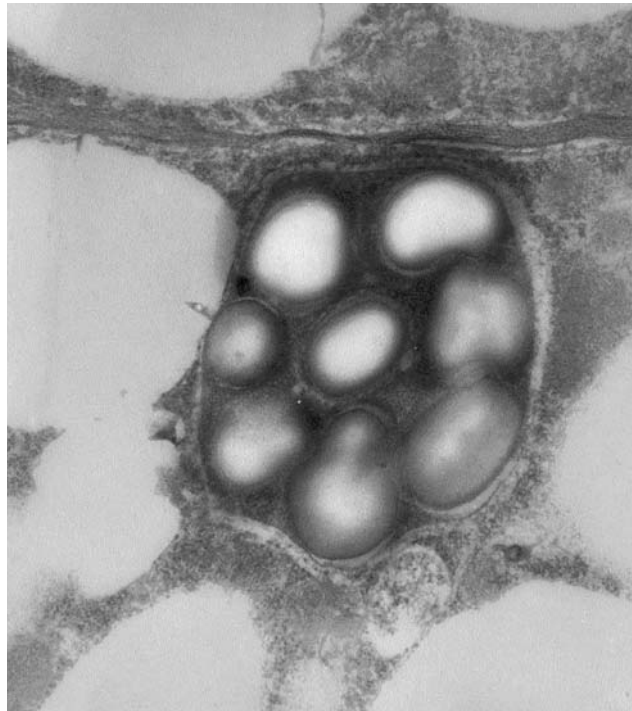


Abb. 3.3.13 Calciumhaltige Einschlusskörper in der unteren Epidermis des sechs Tage alten Ricinuskeimblattes.

3.4 Phosphatferntransport

Das Element Phosphor wird von der Pflanze v.a. in Form von anorganischem Phosphat aufgenommen. Im Gegensatz zu einigen anderen Elementen tritt Phosphor auch direkt als Phosphat bzw. Phosphorsäure in den Stoffwechsel ein. Die Extraktion aus dem Boden ist sehr effektiv. Trotz geringer Phosphorkonzentration im Boden akkumuliert die Pflanze große Mengen in ihrem Kormus. Phosphat-Ionen kommen im Phloem normalerweise in einer Konzentration kleiner als 20 mM vor (Hayashi und Chino, 1985; Zhong *et al.*, 1998). Die Phloembeladung scheint auf apoplastischem Wege zu erfolgen (Zhong *et al.*, 1998). Desweiteren wird Phosphor aber auch in organischer Form in die Siebröhren beladen (Geigenberger *et al.*, 1993). Bei Überangebot sind Höhere Pflanzen in der Lage Phosphorsäure als Phytin zu speichern.

3.4.1 Phosphorverteilung in den einzelnen Kompartimenten der Keimblätter

Phosphor war nicht gleichförmig in den Keimblättern mit Endosperm verteilt (Abb. 3.4.2). Die höchsten Phosphorgehalte wurden im Cytoplasma des Schwamm- und Palisadenparenchyms, die niedrigsten in der unteren und oberen Epidermis gefunden. Der Gehalt im Zellwandraum war unerwartet hoch. Er lag deutlich über der für den apoplastischen Raum zwischen Endosperm und Blattunterseite vorausgesagten freien Phosphatkonzentration von 2 mM, (Abschnitt 3.1.1 und 3.4.2). Im Palisaden- aber auch im Schwammparenchym fand man Phosphor in speziellen Einschlusskörpern. Neben den phosphorhaltigen Plastiden entdeckte man dort noch

Körper, die aufgrund ihrer hohen Elementdichte eine starke Kontrastierung zeigten. Sie enthielten bis zu 10 M Phosphor mit einem Maximum im Schwammparenchym. Große Mengen des Phosphors in den Keimblättern waren somit in speziellen Einschlußkörpern vorhanden (intrazelluläre Kompartimentierung). Mit Unterstützung von E. Fritz (Universität Göttingen) konnten diese Einschlußkörper im Schwamm- und im Palisadenparenchym elementanalytisch untersucht werden. Es handelt sich dabei vermutlich um Phytinsäureablagerung (Mg-Phytat). Anzumerken ist, daß anhand dieser Messungen eine genauere Differenzierung zwischen den einzelnen P-haltigen Verbindungen nicht möglich ist. Um weitere Informationen über die Phosphatverteilung in den einzelnen Kompartimenten der Keimblätter zu erhalten, sollten ^{31}P -NMR-Messungen an den Keimblättern durchgeführt werden.

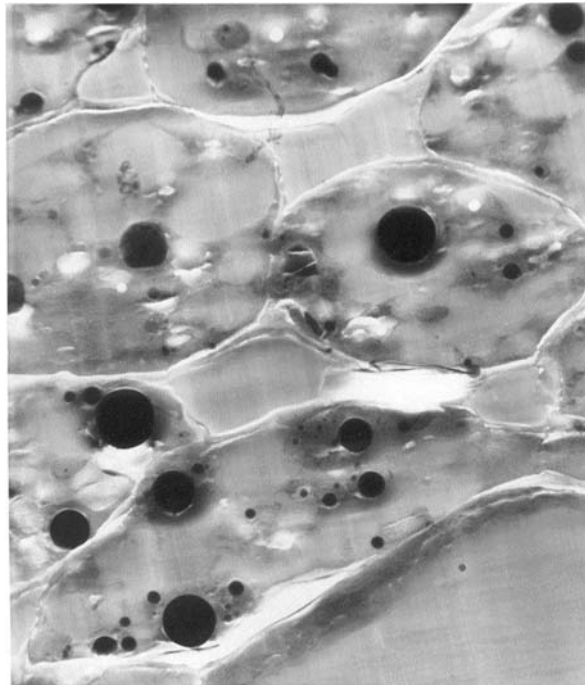


Abb. 3.4.1 Phosphor- und magnesiumhaltige Einschlußkörper im Schwammparenchym des sechs Tage alten Ricinuskeimblattes.

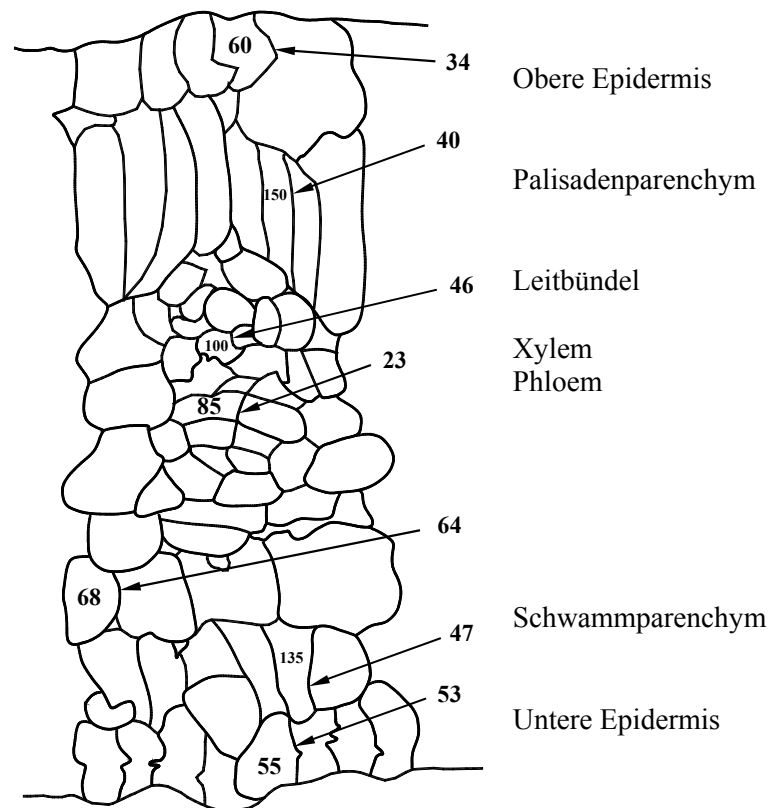


Abb. 3.4.2 Phosphorverteilung in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen mit Endosperm. Illustration der Meßpunkte im Querschnitt. Die Quantifizierung erfolgte anhand von EDX-Analysen. Die Zahlenwerte geben den relativen Gehalt, gewonnen durch den Vergleich mit Standards definierter Konzentrationen (mM), im jeweiligen Meßbereich an.

3.4.2 Phosphattransport nach Equilibrierung über die Keimblätter

Basierend auf Ergebnisse von Zhong (1994) wurde von 2 mM Phosphat im apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm ausgegangen (siehe Abschnitt 3.1.1). Aus diesem Grund setzte man dem Inkubationsmedium zunächst 2 mM Kaliumphosphatpuffer zu, als Vergleich dienten 0,5 mM und 10 mM. Verglichen wurden der Phosphorgehalt (lösliche und unlösliche Bestandteile) und die Konzentration an wasserextrahierbarem Phosphat in den Keimblättern in Abhängigkeit vom externen Angebot. Ferner ging man auf die Wechselwirkungen mit dem Transport in Phloem und Xylem ein. Die Aufnahme in die Keimblätter und der symplastische Efflux wurde bestimmt.

3.4.2.1 Freie Konzentration in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat

Der Phosphorgehalt in den vom Endosperm umgebenen Keimblättern war, bedingt durch die P-haltigen Einschlusskörper hoch (Abb. 3.4.3). Er wurde im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm sowohl durch 0,5 mM als auch durch 2 mM externes Phosphat reduziert. Die Phosphatkonzentration blieb parallel dazu unverändert. Im Gegensatz dazu erhöhte 10 mM externes Phosphat den P-Gehalt und die Phosphatkonzentration in den Keimblättern. Insgesamt gesehen kam es nur bei niedriger und mittlerer apoplastischer Konzentration zu einem Nettoverlust

von P aus den Keimblättern. Der Anteil des anorganischen Phosphats am Gesamtphosphor lag unabhängig vom externen Angebot zwischen 60 % und 80 %.

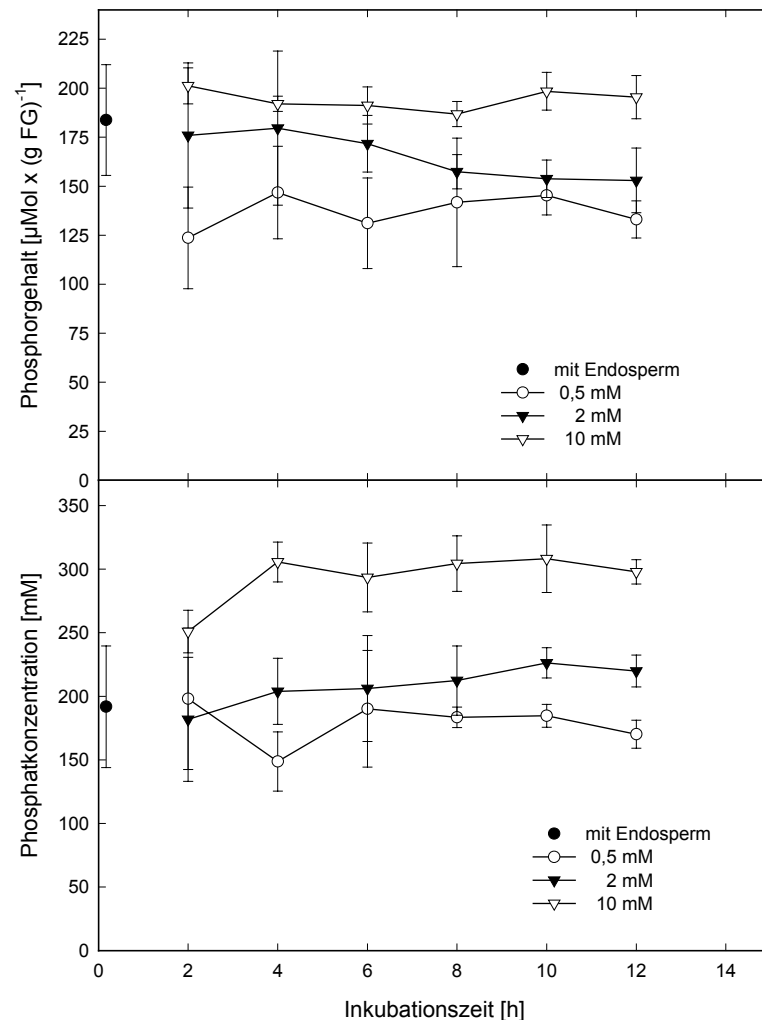


Abb. 3.4.3 Etablierung der *steady state*-Situation für die Phosphorgehalte und Phosphatkonzentrationen in den Keimblättern sechs Tag alter *Ricinus*keimlinge nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Die Phosphatkonzentration in den Keimblättern wurde aus dem Phosphatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % berechnet. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

Schachtmann *et al.* (1998) sprechen davon, daß schon 70 % anorganisches Phosphat im Blatt toxisch wirken. Es kann die Frage gestellt werden, ob der Phosphatanteil in den Keimblättern wirklich so *hoch* ist oder ob es sich um einen Artefakt bei der Messung bzw. bei der Extraktion handelt. Um einen Artefakt auszuschließen, wurde die Wiederfindung von extra zugegebenen phosphorhaltige Verbindungen wie ATP und ADP bestimmt. Sie wurden durch den Test nicht erfaßt. Die Vermutung lag nahe, daß bei der Extraktion (10 min Erhitzen) Inositolphosphate, die

reichlich im Keimblätter vorhanden sind, gespalten werden. Aus diesem Grund wurde mit einem 70 %igem Gemisch aus Diethylether/Wasser (v/v) ohne Erhitzen extrahiert und die wäßrige Phase zur Messung herangezogen. Diese Methode bestätigte die in Abb. 3.4.3 gezeigten Ergebnisse.

Die Phosphatkonzentration im Siebröhrenexsudat übertraf bei allen externen Konzentrationen die der Keimlinge mit Endosperm (Abb. 3.4.4). Auch 2 mM Phosphat ließen die Konzentration ansteigen, obwohl vermutet wurde, daß die natürliche apoplastische Konzentration ca. 2 mM beträgt (Tab. 3.1.1). Der Phosphortransport bei Keimlingen mit Endosperm erfolgt im Phloem zu 2/3 in Form von organischen Phosphorverbindungen (1:2-Transport von Phosphat und organischen P-Verbindungen; Komor *et al.*, 1996). Man kann sich die Frage stellen, ob durch das apoplastische Angebot auch der Transport von organischen Phosphorverbindungen betroffen ist (Tab. 3.4.1). Schon 0,5 mM externes Phosphat führte zu einem 2:1-Transport von Phosphat organischem Phosphor und somit zu einer eindeutigen Umkehr des natürlichen Verhältnisses. Der Export aus den Keimblättern übertraf den durch Wuchsanalyse ermittelten Bedarf um ca. 1/3 (Tab. 1 Anhang). Erhöhte man die apoplastische Konzentration auf 2 mM bzw. 10 mM, stieg sowohl die Phosphat- als auch die Phosphorkonzentration an, das Verhältnis zwischen beiden änderte sich nicht.

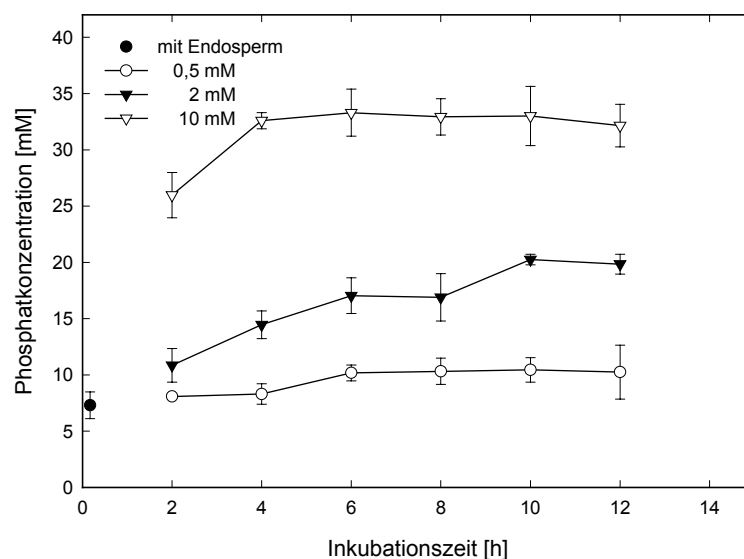


Abb. 3.4.4 Etablierung des *steady state*-Situation für Konzentrationen von Phosphat im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Kaliumphosphat pH 5,5 in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 10 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Tab. 3.4.1 Phosphor- und Phosphatkonzentration im Siebröhrenexsudat nach 8stündiger Inkubation der Keimblätter in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zur Bestimmung der Phosphorkonzentration wurde das Exsudat von 5 Keimlingen zur Messung vereinigt. Es sind jeweils Mittelwert und Standardabweichungen angegeben (n=3). Die Konzentration des organisch gebundenen Phosphors wurde aus der Differenz zwischen Phosphor und Phosphat errechnet.

externe Bedingungen	Konzentrationen im Siebröhrenexsudat [mM]		
	Phosphor	Phosphat	organischer Phosphor
0,5 mM Phosphat	14,10 \pm 1,63	10,32 \pm 1,17	3,78
2 mM Phosphat	30,52 \pm 2,74	16,89 \pm 2,10	13,63
10 mM Phosphat	45,63 \pm 5,43	32,93 \pm 1,61	12,70

3.4.2.2 Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem

Damit Diffusionsprozesse und Massenflüsse überhaupt erfolgen können, müssen Gradienten zwischen den beteiligten Kompartimenten bestehen. Diffusionsprozesse erfordern einen Konzentrationsunterschied, während für einen Massenfluß eine Druckdifferenz existieren muß. Die Aufnahmeaktivität der Zellen reguliert wiederum die Verteilung in den Geweben. Der Phosphatpool in den Keimblättern war bereits bei niedriger apoplastischer Konzentration groß und eindeutig durch die apoplastische Konzentration beeinflussbar (Abb. 3.4.5). Es kam jedoch zu keinem proportionalen Anstieg der Phosphatkonzentration mit dem externen Angebot. Die Konzentration im Siebröhrenexsudat übertraf in allen Fällen die des Mediums. Der Akkumulationsfaktor zwischen Phloem und künstlicher Apoplastenlösung sank von ca. 20 auf ungefähr 3 (Tab. 3.4.2).

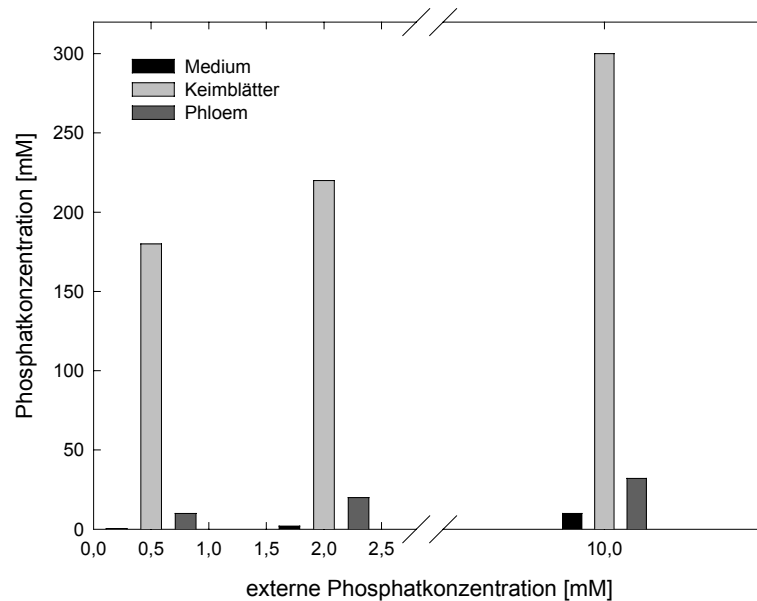


Abb. 3.4.5 Vergleich der *steady state*-Konzentrationen im Medium (künstliche Apoplastenlösung), in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter in 0,5 mM, 2 mM oder 10 mM Phosphat. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Phosphatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

Tab. 3.4.2 Akkumulationsfaktoren unter *steady state*-Bedingungen für Phosphat zwischen dem Medium (künstliche Apoplastenlösung), den Keimblättern und dem Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter in 0,5 mM, 2 mM oder 10 mM Phosphat. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Phosphatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

externe Bedingungen	<u>Keimblätter</u>	<u>Siebröhrenexsudat</u>
	Medium	Medium
0,5 mM Phosphat	360	20
2 mM Phosphat	110	10
10 mM Phosphat	30	3

3.4.2.3 Phosphat-Massenflußraten in Phloem und Xylem

Um die Frage nach einer potentiellen Phosphatzirkulation zu beantworten, wurden die Wurzeldruckexsudate der equilibrierten Keimlinge untersucht und die Massenflußraten errechnet. Die Phosphatkonzentration im Wurzeldruckexsudat von Keimlingen mit Endosperm betrug ca. 2,5 mM (Abb. 3.4.6) Sie wurde durch die Inkubation in 0,5 mM und 2 mM Phosphat an den Keimblättern kaum beeinflusst. Nur 10 mM externes Phosphat erbrachten eine signifikante Steigerung annähernd um den Faktor 2,5.

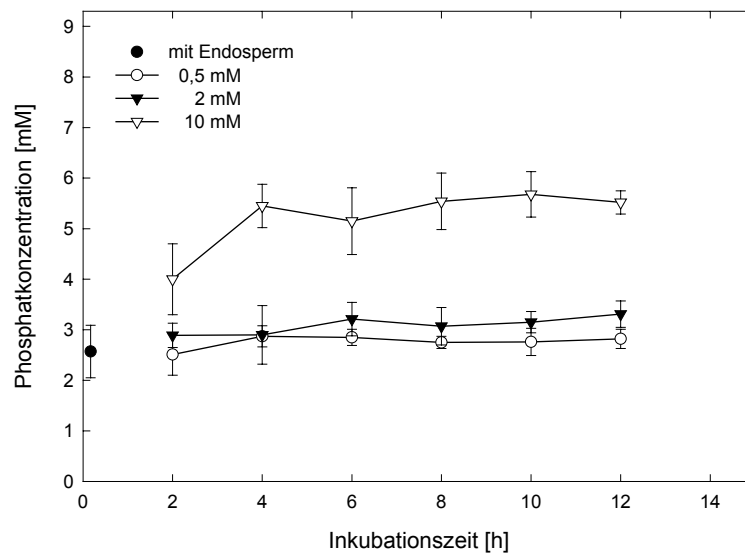


Abb. 3.4.6 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Phosphat im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 20 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Der Volumenfluß im Phloem betrug durchschnittlich $23 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ und war im Vergleich zu den anderen Substraten etwas erhöht. Im Xylem zeigte dies keine Auswirkungen (Abschnitt 3.1.2.1). Der Massenfluß im Xylem stieg mit der apoplastischen Konzentration an (Tab. 3.4.3). Besonders bei der hohen apoplastischen Konzentration von 10 mM wurde deutlich, daß ein großer Teil des aus den Keimblättern exportierten Phosphats nicht über das Xylem in die Keimblätter zurückkehrte. Insgesamt gesehen kann gesagt werden, daß Phosphat im Keimling zirkuliert, das Ausmaß der Zirkulation jedoch gering ist.

Tab. 3.4.3 *Steady state*-Massenflußraten für Phosphat im Phloem und Xylem sechs Tage alter Ricinuskeimlingen. Die Keimblätter intakter Keimlinge wurden für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben ($n=3 \times 3$).

externe Bedingungen	Phosphat-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Phloem	Xylem
0,5 mM Phosphat	$0,18 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
2 mM Phosphat	$0,29 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
10 mM Phosphat	$0,60 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01$

Wie schon Versuche von Zhong (1994) zeigten, ist die Volumenflußrate im Phloem nach Transfer der Keimblätter in Phosphat hoch. Bei Langzeitexsudation kommt es zu einer Auffälligkeit bei 30 mM Phosphat. Innerhalb acht Stunden nimmt der Volumenfluß kontinuierlich ab, um danach wieder deutlich anzusteigen. Es ist denkbar, daß der hohe Phosphatfluß die Menge an transportiertem freien Calcium reduziert und somit negativ auf die Kallosesynthese einwirkt.

Der Rücktransport von Phosphat im Xylem war verglichen mit dem Phloemtransport von Phosphat- und organischen Phosphorverbindungen sehr gering. Schon bei einer apoplastischen Konzentration von 0,5 mM Phosphat könnte der Phosphorbedarf im *sink* allein durch den Phosphateintrag gedeckt werden (Tab.1 Anhang).

3.4.2.4 Phosphataufnahme in die Keimblätter und symplastischer Efflux

Zur Quantifizierung der unidirektionalen Aufnahme in die Keimblätter wurden intakte Keimlinge bis zur Etablierung der *steady state*-Bedingung in unmarkiertem Medium vorinkubiert. Danach übertrug man die Keimblätter in eine radioaktiv-markiertes Phosphat enthaltende Lösung gleicher Konzentration. Die in den Keimling aufgenommene Radioaktivität wurde quantifiziert und der lineare Bereich ausgewertet. Durch umgekehrte Markierungsfolge wurde der Phosphatefflux aus dem Zellen der Keimblätter bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.1 und 2.7.2). Die Aufnahme in die Keimblätter stieg parallel zur apoplastischen Konzentration an, aber nicht linear. Der Efflux aus den Zellen in den Apoplasten war gering und bei allen Konzentrationen in einer Größenordnung von ungefähr 10 % der Aufnahme (Tab. 3.4.4).

Tab. 3.4.4 Unidirektionale Phosphataufnahme bzw. unidirektionaler –efflux unter *steady state*-Bedingungen nach Inkubation der Keimblätter in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind jeweils Mittelwert und Standardabweichungen angegeben (n=9).

externe Bedingungen	Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Aufnahme	Efflux
0,5 mM Phosphat	$0,30 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$
2 mM Phosphat	$0,45 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,01$
10 mM Phosphat	$0,85 \pm 0,10$	$0,08 \pm 0,02$

Die Phosphataufnahme war konzentrationsabhängig, stieg jedoch nicht linear zum externen Angebot. Zwischen 2 mM und 10 mM externen Phosphat blieb sie leicht hinter den *Erwartungen* zurück. Es zeigte sich eine beginnende Sättigung. Der symplastische Efflux war gering.

3.4.3 Phosphattransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Phosphat über die Wurzel angeboten, die Keimblätter tauchten während der Inkubation in einer Lösung aus 100 mM Saccharose, 0,2 mM Calciumchlorid und Puffer ein. Die Konzentrationen im Wurzelmedium waren 0,5 mM, 2 mM und 10 mM anorganisches Phosphat. Diese Konzentrationen wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Flüsse gewählt, wohl wissend, daß die Phosphatkonzentration im Boden sehr gering, ungefähr um einen Faktor 100 erniedrigt ist. Im Mittelpunkt der Betrachtung standen die Auswirkungen eines erhöhten Xylemtransports auf die Situation in den Keimblättern und den Langstreckentransport im Phloem.

3.4.3.1 Phosphattransport im Xylem und Import in die Keimblätter

Die Phosphatkonzentration im Wurzeldruckexsudat zeigte eine Abhängigkeit vom externen Angebot (Abb. 3.4.7). Sie war, wie bereits gezeigt, bei Keimlingen mit Endosperm sehr gering, sie ließ sich aber schon nach 2stündiger Inkubation beeinflussen. Vergleicht man die Phosphatkonzentrationen im Wurzeldruckexsudat nach Equilibrierung über die Keimblätter (Abb. 3.4.6) mit derjenigen nach Equilibrierung über die Wurzel, fällt auf, daß das Phosphatangebot an der Wurzel die Phosphatkonzentration im Wurzeldruckexsudat merklich erhöht.

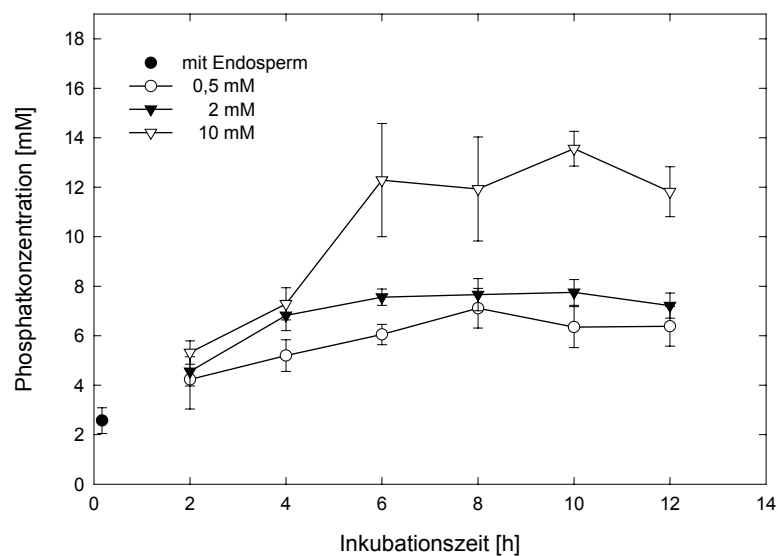


Abb. 3.4.7 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Phosphat im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 15 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

In den Keimblättern zeigte sich, aufgrund der Größe des P_i -Pools dort, keine deutliche Abhängigkeit von den externen Bedingungen (Abb. 3.4.8). Auch der Phosphorgehalt stieg nur unwesentlich an (Tab. 3.4.5). Die Phosphatkonzentration im Siebröhrenexsudat wurde nur nach Transfer in eine hohe Konzentration im Wurzelmedium (10 mM Phosphat) verändert (Abb. 3.4.8).

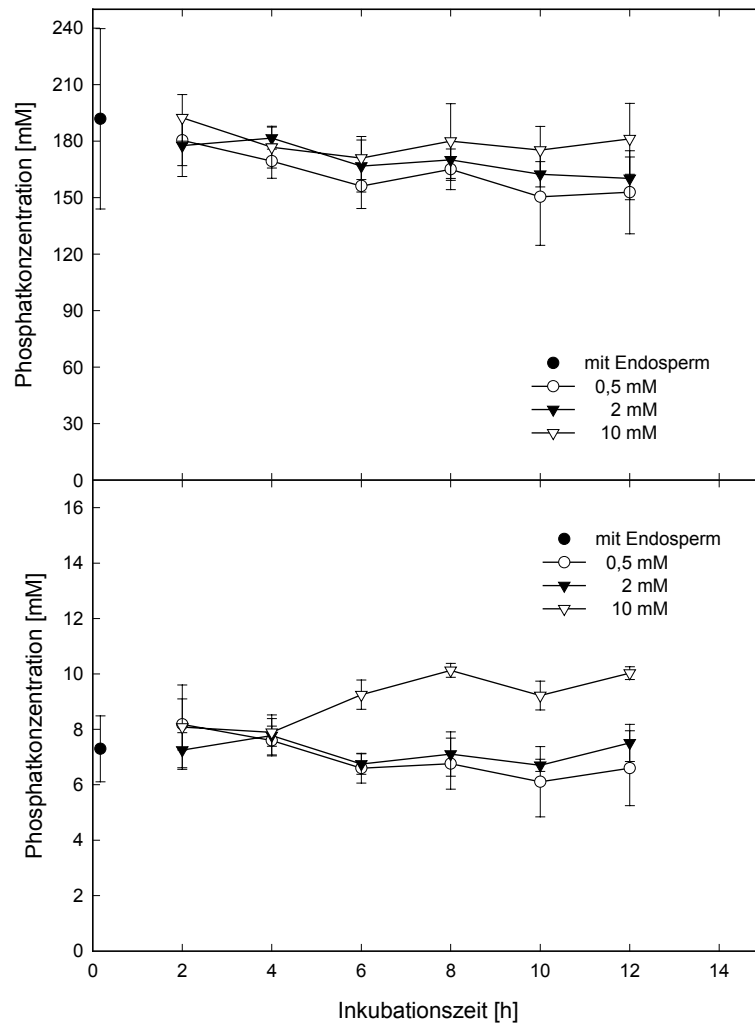


Abb. 3.4.8 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Phosphat in den Keimblätter und im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM $CaCl_2$ und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM $CaCl_2$ ein. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Phosphatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils der Keimblätter von 55 % errechnet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 20 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Tab. 3.4.5 Phosphorgehalt in den Keimblättern nach 10stündiger Inkubation der Wurzeln in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Es sind jeweils Mittelwert und Standardabweichungen angegeben (n=9).

externe Bedingungen	Phosphorgehalte [$\mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$]
0,5 mM Phosphat	190,7 \pm 12,9
2 mM Phosphat	194,4 \pm 8,3
10 mM Phosphat	200,8 \pm 9,7

3.4.3.2 Vergleich der Phosphatflüsse in Xylem und Phloem

Während die Volumenflußrate im Xylem zwischen 47 und 52 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ schwankte, betrug sie im Phloem ca. 19 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Aus der Phosphatkonzentration in den jeweiligen Exsudaten und den gemessenen Volumenflußraten, wurden die Massenflußraten errechnet. Die Massenflüsse von Phosphat im Phloem ließen sich durch das externe Phosphatangebot über die Wurzel nur unwesentlich beeinflussen. Der Xylemfluß nahm mit steigender Phosphatkonzentration im Wurzelmedium deutlich zu (Tab. 3.4.6). Zur Diskussion steht, ob das im Überschuß in die Keimblätter importierte P_i in Form von organischen P-Verbindungen erneut ins Phloem beladen wird.

Tab. 3.4.6 *Steady state*-Massenflußraten für Phosphat im Xylem und Phloem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Phosphat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Phosphat-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Xylem	Phloem
0,5 mM Phosphat	0,32 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
2 mM Phosphat	0,36 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
10 mM Phosphat	0,59 \pm 0,03	0,17 \pm 0,01

3.4.4 Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.4.7) sind die nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten und nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten erzielten Massenflüsse in Phloem und Xylem einander gegenübergestellt.

Tab. 3.4.7 Vergleich der *steady state*-Massenflüsse von Phosphat nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten oder über den Wurzelapoplasten.

externe Bedingungen		Equilibrierung über Keimblätter	Equilibrierung über Wurzel
	Phloem		Phloem
0,5 mM Phosphat		$0,18 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
2 mM Phosphat		$0,29 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$
10 mM Phosphat		$0,60 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,01$
	Xylem		Xylem
0,5 mM Phosphat		$0,13 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
2 mM Phosphat		$0,16 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$
10 mM Phosphat		$0,26 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,03$

3.4.5 Gleichzeitiges Angebot von Phosphat über die Keimblätter und die Wurzel

In Annäherung an die *in vivo*-Situation wurde in dieser Versuchsreihe Phosphat sowohl über die Keimblätter als auch über die Wurzel angeboten (Tab. 3.4.8). Die Phosphatkonzentration im Wurzelmedium betrug in allen Fällen 0,5 mM Phosphat. Der Apoplastenlösung der Keimblätter wurden entweder 0,5 mM, 2 mM oder 10 mM Phosphat zugesetzt. Mit diesem Versuch sollten v.a. die apoplastischen Bedingungen im Bereich des Phloems manipuliert werden.

Sowohl die Phosphatkonzentrationen in den Keimblättern als auch diejenige des Siebröhrenexsudats waren bei 0,5 mM Phosphat (an der Wurzel und an den Keimblättern) schon hoch. Durch die Erhöhung des apoplastischen Phosphatangebots an den Keimblättern stiegen beide weiter an, wobei der Effekt auf die Phloembeladung nicht sehr deutlich ausgeprägt war. Der Phosphatimport in die Keimblätter war im Vergleich zur Equilibrierung über den Keimblattapoplasten gesteigert, erniedrigt im Vergleich zur Equilibrierung über die Wurzel. Zur Phosphatbeladung des Xylem scheint folglich nicht nur die Phosphataufnahme aus dem Wurzelapoplasten eine Rolle zu spielen, sondern auch die Phosphatanlieferung in die Wurzel über das Phloem. Kommt es zu einem hohen Phosphateintransport in die Keimblätter, wird der Export von Phosphat über das Phloem erhöht. Wenn die apoplastische Konzentration gleichzeitig bereits hoch ist, wird der Export insgesamt reduziert. Der Volumenfluß im Phloem betrug durchschnittlich $18 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$, der im Xylem ca. $48 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$.

Tab. 3.4.8 Abhängigkeit der Phosphatkonzentration in den Keimblättern, im Siebröhren- und im Wurzeldruckexsudat von den Inkubationsbedingungen. Die Wurzeln sechs Tage alter Ricinuskeimlinge wurden für definierte Zeiträume in 0,5 mM Phosphat und die Keimblätter in 0,5 mM, 2 mM oder 10 mM Phosphat inkubiert. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Keimblätter	Phosphat-Konzentrationen [mM]	
		Siebröhrenexsudat	Wurzeldruckexsudat
0,5 mM Phosphat	203,3 ± 11,4	21,53 ± 2,45	4,37 ± 1,49
2 mM Phosphat	240,5 ± 20,1	24,24 ± 1,45	4,65 ± 2,04
10 mM Phosphat	320,0 ± 17,9	27,38 ± 3,17	6,94 ± 2,30

Equilibriert man Phosphat gleichzeitig über die Keimblätter und die Wurzel kam es zu einer Verschiebung der Phloem- und der Xylemflüsse. Beide waren im Vergleich zur *Einzelinkubation* erniedrigt.

3.4.6 Phosphorverteilung im Hypokotyl

Auch das Element Phosphor war v.a. im oberen, apikalen Abschnitt des Hypokotyls festgelegt (Abb. 3.4.9). Im Bereich der Verdickungszonen fiel der Phosphorgehalt im Vergleich zum Kohlenstoffgehalt überproportional ab. Im basalen Teil war er um einen Faktor von 3-4 erniedrigt. Entsprechendes traf auch auf sieben Tage alte Keimlinge zu. Das apikale Hypokotyl ist basierend auf den Überlegungen von Köckenberger (1995) der Ort der größten Phosphatentladung (Abschnitt 3.2.6).

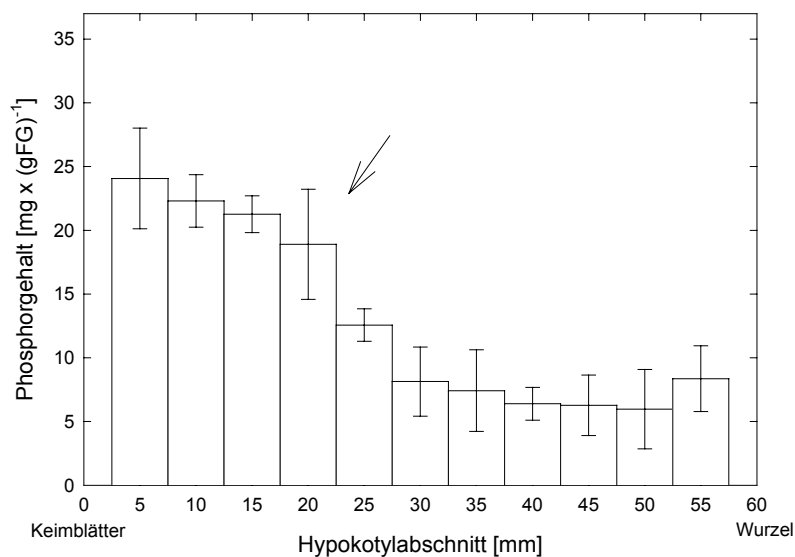


Abb. 3.4.9 Phosphorverteilung entlang des Hypokotyls von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen. Es wurden 5 mm lange Hypokotylabschnitte zur Bestimmung herangezogen. Die Lage der Verdickungszone ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

3.4.7 Phosphatfluß in den Wurzelapoplasten

Phosphat wird sehr gut in die Keimblätter aufgenommen und schnell und im hohen Maße für den Export zur Verfügung gestellt. In der Wurzel angekommen, kann Phosphat ins Xylem gelangen und zurück in die Keimblätter transportiert werden. Neben dem anorganischen Phosphat stehen auch organische Phosphorverbindungen zur Ernährung der Pflanze zur Verfügung. Organische Phosphorverbindungen kommen im Xylem in einer Konzentration von maximal 1 mM vor (n=6). Nach Equilibrierung über die Keimblätter erreichte im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm mehr Phosphor die Wurzel. Es stellt sich die Frage nach dem Verbleib des zusätzlich in die Wurzel gelieferten Phosphors. Neben einer erhöhten Metabolisierung könnte es auch, wie für Saccharose und Glutamin gezeigt wurde (Schobert, 1988), zu einem Efflux von Phosphat aus dem Apoplasten der Wurzel kommen. Bei diesen Effluxmessungen wurde das Auftauchen von Radioaktivität im Medium der Wurzel nach Angebot von radioaktivem Phosphat über die Keimblätter untersucht. Es zeigte sich, daß bei 0,5 mM und 2 mM Phosphat an den Keimblättern kein Phosphatefflux nachweisbar war. 10 mM Phosphat führen zu einem Efflux von durchschnittlich $0,06 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ (n=6). Folglich gehen ungefähr 10 % des exportierten Phosphats aus dem Wurzelapoplasten verloren.

3.4.8 Wechselwirkungen zwischen der Phosphatkonzentration in den Keimblättern und der Phosphortranslokation

Für Phosphat konnte gezeigt werden, daß dieser Efflux aus den Zellen der Keimblätter von der apoplastischen Konzentration abhing und in allen Fällen ungefähr 10 % der Aufnahme ausmachte. Extrapoliert man den Efflux aus dem Keimblätter gegen die symplastische Phosphatkonzentration, erkennt man, daß der Efflux die x-Achse nicht bei Null, sondern bei ca. 100-120 mM intrazellulärem Phosphat schneidet. Wie bereits bei Saccharose und Kalium erwähnt, kann man auch hier spekulieren, ob der Symplast unter dieser intrazellulären Konzentration noch Phosphat an den Apoplasten und aufgrund der bevorzugt apoplastischen Phloembeladung (Zhong *et al.*, 1998) an das Phloem abgibt (Abb. 3.4.10). Um weitere Aufschlüsse zu gewinnen, wurden *künstlich verarmte Ricinuskeimlinge* untersucht.

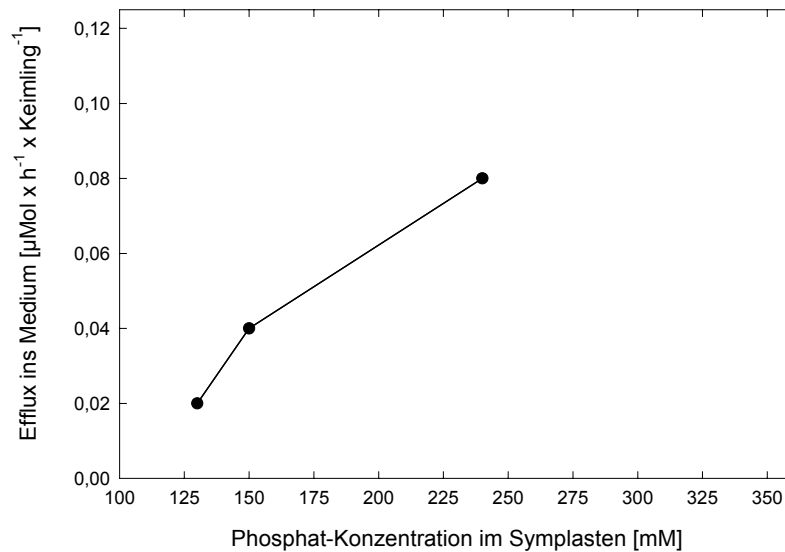


Abb. 3.4.10 Phosphatefflux aus dem Symplasten der Keimblätter sechs Tage alter Ricinuskeimlinge inkubiert in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und 0,5 mM, 2 mM oder 10 mM Phosphat. Die symplastische Konzentration wurde aus dem Phosphatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

3.4.8.1 Phosphortransport nach fehlender apoplastischer Versorgung

Für diesen Ansatz wurde das Endosperm am Tag 3 entfernt, die Ernte der Keimlinge erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Es wurde die Phosphormenge in den einzelnen Organen der Keimlinge untersucht. Aus dem Zuwachs zog man Rückschlüsse auf die Flüsse. Eine Gewinnung von Exsudaten war in diesem frühen Stadium der Entwicklung und aufgrund des Nährstoffmangels nicht möglich (Abschnitt 3.2.9). Die Keimblätter exportierten zwischen Tag 3 und Tag 4 ca. 1/3 ihrer Phosphormenge (Abb. 3.4.11). Die Festlegung des Phosphors erfolgte in dieser Zeit v.a. in der Wurzel. Die Wurzel zeigte optisch das größte Wachstum, das somit nicht nur auf Zellelongation durch Wasseraufnahme zurückzuführen ist, sondern auch auf eine Zunahme der Menge an Trockensubstanz. Zwischen Tag 5 und Tag 6 drehte sich die Haupttransportrichtung. Bei den üblicherweise untersuchten Keimlingen liegen ungefähr 2/3 des Phosphors als Phosphat vor (Abb. 3.4.3). Dies war auch hier der Fall. Die geforderte untere Schwellenkonzentration für den Phosphatexport (ca. 100 mM) wurde am Tag 4 erreicht (Tag 3: 328 mM; Tag 4: 44 mM; Tag 5: 22 mM).

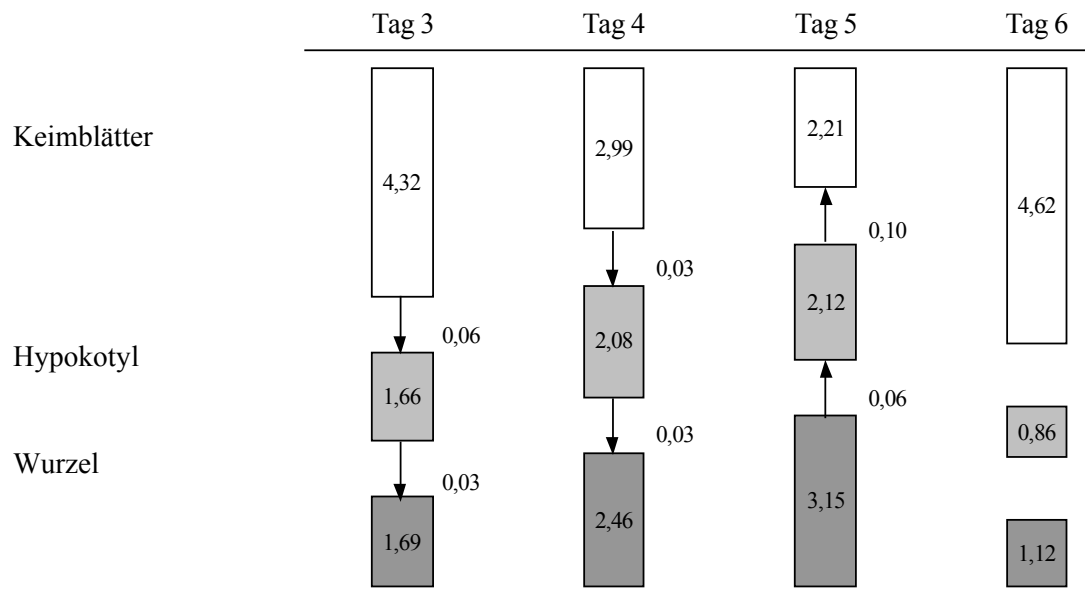


Abb. 3.4.11 Phosphormenge [μMol] in den einzelnen Organen von Ricinuskeimlingen nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms. Das Endosperm wurde am Tag 3 entfernt. Die Ernte der Gewebe erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Die Translokationsraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] wurden aus dem Zuwachs der verschiedenen Organe errechnet. Sie sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben ($n \geq 4$).

3.4.8.2 Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter

Es kann gefragt werden, ob es auch mit steigendem Alter zu einer Situation kommen kann, bei der der Symplast kein P_i für den Export zur Verfügung stellt. Untersucht wurde dazu der Phosphor- und Phosphatgehalt in 8 bis 24 Tage alten Keimblättern. Der Phosphorgehalt der Keimblätter betrug zu allen Zeiten ca. $500 \mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$ (Abb. 3.5.12). Schon bei den Keimblättern sechs Tage alter Keimlinge lag Phosphor zu mehr als 50 % als Phosphat vor, gleiches galt für die älteren Keimblätter. Der Phosphatgehalt war über die Periode der Anzucht konstant. Unabhängig vom Alter und dem Entwicklungszustand der Keimblätter wurde die geforderte untere Schwellenkonzentration für den Phosphatexport jedoch kaum erreicht. Bei Keimlingen, die bis zum Tag 14 ohne zusätzliche Nährstoffzufuhr angezogen wurden, nahm der Phosphor- und Phosphatgehalt in den Keimblättern kontinuierlich ab (Tab. 3.4.9).

Tab. 3.4.9 Phosphor- und Phosphatgehalte in den Keimblättern älterer Keimlinge. Untersucht wurden Pflanzen, die bis zum Tag 14 auf nährstofffreiem Medium verblieben ($n=6$).

	Gehalte [$\mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$]			
	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14
Phosphor	644 ± 88	524 ± 79	561 ± 70	513 ± 29
Phosphat	207 ± 87	315 ± 91	191 ± 75	129 ± 40

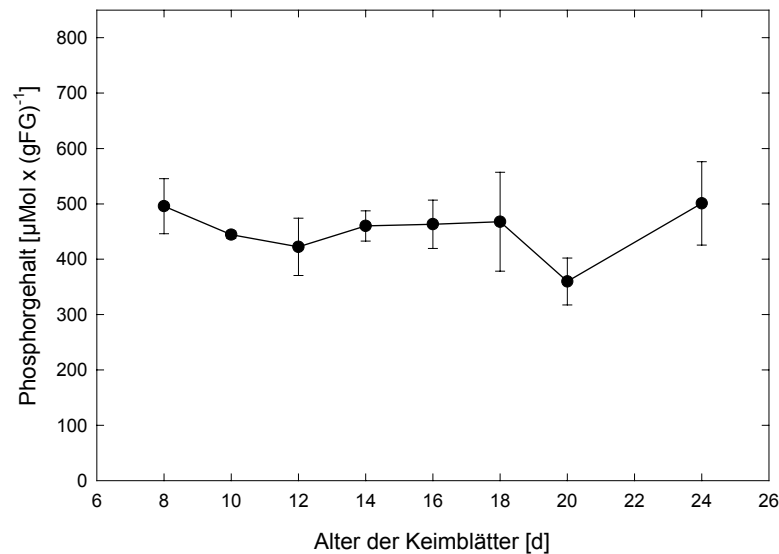


Abb. 3.4.12 Abhängigkeit des Phosphorgehalts vom Alter der Keimblätter. Die Ricinuspflanzen wurden nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit phosphathaltiger Nährlösung. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

3.5 Sulfatfernttransport

Schwefel gehört zu den essentiellen Bestandteilen aller lebenden Organismen. Er ist z.B. Baustein der Aminosäuren Cystein und Methionin, des Tripeptides Glutathion, sowie der Fe-S-Redoxzentren und der Thioedoxine. Pflanzen, Bakterien und Pilze können diese Stoffe durch Assimilation von Sulfat aus ihrer Umgebung bilden. Die Sulfatassimilation findet im allgemein in den Blättern statt (Fankhauser und Brunold, 1978). Schwefel kommt im Pflanzen in weitaus geringeren Mengen als Kalium und Phosphor vor. Im Ricinuskeimling wird er zumindest im Phloem sowohl in organischer Form als auch in anorganischer Form als Sulfat transportiert (Komor *et al.*, 1996), die Sulfatbeladung erfolgt bevorzugt auf apoplastischem Weg (Zhong *et al.*, 1998).

3.5.1 Schwefelverteilung in den einzelnen Kompartimenten der Keimblätter

Untersucht wurde der Schwefelgehalt in den einzelnen Zellen, den subzellulären Kompartimenten aber auch im Zellwandraum der Keimblätter von sechs Tage alten Keimlingen mit Endosperm (Abb. 3.5.1). Die höchsten Schwefelgehalte fand man im Cytoplasma der unteren Epidermis und des Schwammparenchyms. Auch im Palisadenparenchym und der oberen Epidermis kam viel Schwefel vor. Insgesamt gesehen waren die intrazellulären Gehalte außerhalb der Bündelscheide erhöht, innerhalb reduziert. Der apoplastische Gehalt war maximal an der *Eintrittsstelle* der Substrate, d.h. um die Zellen der unteren Epidermis, und im Bereich des Phloems. Während der intrazelluläre Gehalt entlang des Phloembeladungsweges abnahm, stieg der apoplastische parallel dazu leicht an. In Plastiden war erstaunlicherweise kein S nachweisbar, die

Einschlußkörper enthielten ca. 100 mM, somit deutlich weniger als Phosphor und Magnesium. Vergleicht man die durch EDX-Messungen ermittelten Gehalte und den Gesamtgehalt besteht eine gute Übereinstimmung (Abschnitt 3.5.2; Zhong *et al.*, 1998).

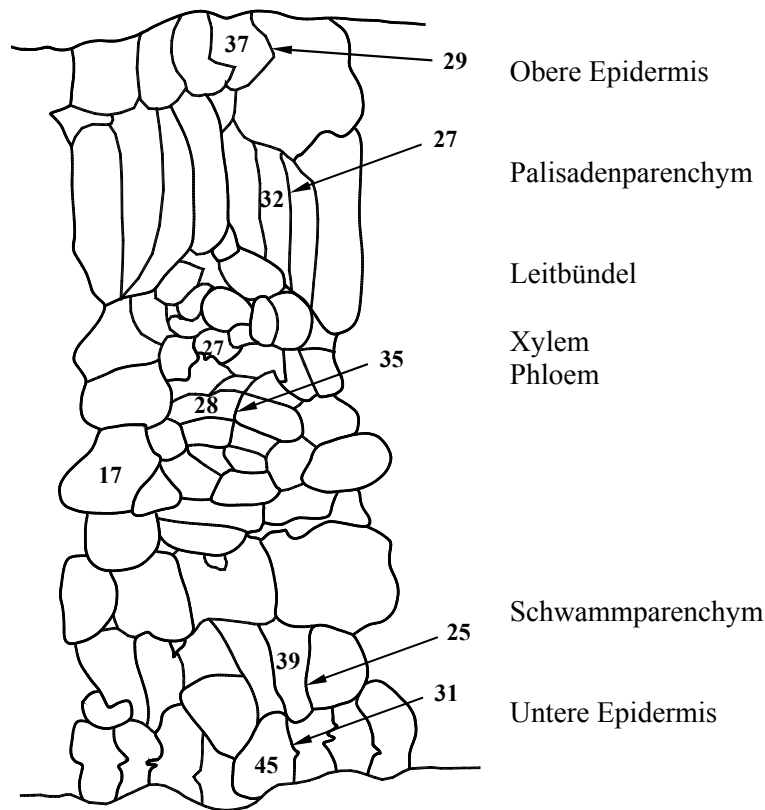


Abb. 3.5.1 Schwefelverteilung in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen mit Endosperm. Illustration der Meßpunkte im Querschnitt. Die Quantifizierung erfolgte anhand von EDX-Analysen. Die Zahlenwerte geben den relativen Gehalt, gewonnen durch den Vergleich mit Standards definierter Konzentrationen (mM), im jeweiligen Meßbereich an.

3.5.2 Sulfattransport nach Equilibrierung über die Keimblätter

Um die Rolle des Apoplasten beim Sulfattransport zu untersuchen, wurden die Keimblätter an sechs Tage alten Ricinuskeimlingen in drei verschiedenen konzentrierten Sulfatlösungen inkubiert. Zunächst wurde dem Medium um die Keimblätter 5 mM Sulfat zugegeben, da dies die vermutete *in vivo*-Konzentration zwischen dem Endosperm und der Unterseite der Keimblättern ist (Abschnitt 3.1.1; Zhong, 1994). Zum Vergleich dienten 2 mM und 15 mM Sulfat. Es wurden die neuen *steady state*-Bedingungen in den Keimblättern, in den Siebröhren und im Xylem etabliert. Zusätzlich dazu bestimmte man die Sulfataufnahme in die Keimblätter und der Efflux aus dem Parenchymzellen in Abhängigkeit vom externen Angebot.

3.5.2.1 Freie Konzentration in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat

Nur etwa 1/3 des Schwefels in den Keimblättern mit umgebendem Endosperm lag in Form von Sulfat vor, 2/3 waren in anderen schwefelhaltigen Verbindungen gebunden. Dafür kommen v.a. freie Aminosäuren, Peptide, Proteine und Sulfolipide in Frage. Der Schwefelgehalt der Keimblätter veränderte sich durch die Inkubation kaum. Etwas anders sah es bei der Sulfatkonzentration aus. Nach Transfer in 5 mM Sulfat blieb sie unbeeinflusst. 2 mM Sulfat verringerte die Sulfatkonzentration der Keimblätter. Bei 15 mM Sulfat stieg sie hingegen leicht an. Es kam folglich zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Schwefel zu Sulfat. Es nahm mit steigendem externen Sulfatangebot ab. Insgesamt gesehen war bei allen drei Bedingungen anteilig mehr Sulfat in den Keimblättern enthalten (Abb. 3.5.2).

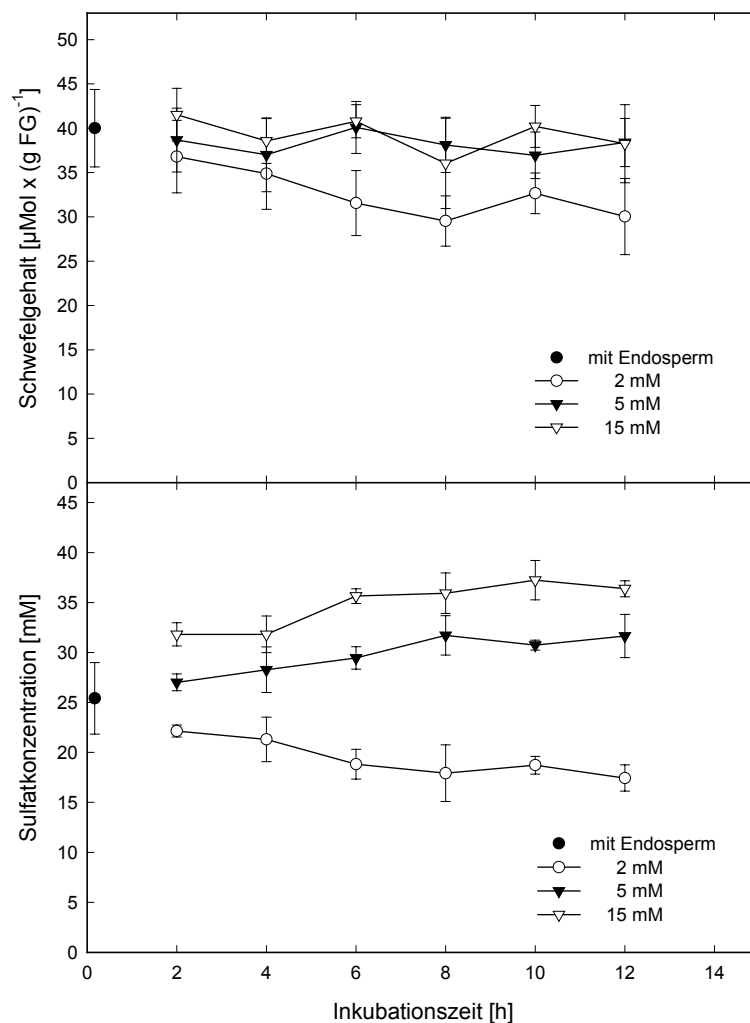


Abb. 3.5.2 Etablierung der *steady state*-Situation für die von Schwefelgehalte und Sulfatkonzentrationen in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Die Sulfatkonzentration in den Keimblättern wurde aus dem Sulfatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % berechnet. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

Inkubierte man die Keimlinge mit ihren Keimblättern in einem Medium aus Natriumsulfat, 100 mM Saccharose, 0,2 mM CaCl_2 und 5 mM MES (NaOH, pH 5,5) nahm der Volumenfluß des Phloems stark ab. Die resultierende Sulfatmassenflußrate lag weit unter der des Xylem. Da das Medium die einzige Nährstoffquelle war, würde dies bedeuten, daß es unabhängig vom Angebot zu einer Mobilisierung von Schwefelspeichern im Hypokotyl und der Wurzel kam. Dies ist unwahrscheinlich. Versuche mit Kalium-, Calcium- und Magnesiumsulfat erbrachten keine Veränderung der Volumenflußraten. Erst nach einem Wechsel der Samenvarietät kam es zu einer deutlichen Veränderung. Für die folgenden Versuche wurde deshalb *Ricinus communis* var. Carmencita verwendet.

Der Transfer der Keimblätter in sulfathaltige Medien beeinflusste auch die Sulfatkonzentration im Siebröhrenexsudat. Bei Keimlingen mit Endosperm fand man im Siebröhrenexsudat durchschnittlich 1,60 mM Sulfat. Während 2 mM externes Sulfat die Konzentration im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm leicht absinken ließen, stieg sie sowohl bei 5 mM als auch bei 15 mM apoplastischem Sulfat an. Der Unterschied zur *in vivo*-Situation war besonders gering bei 5 mM Sulfat (Abb. 3.5.3).

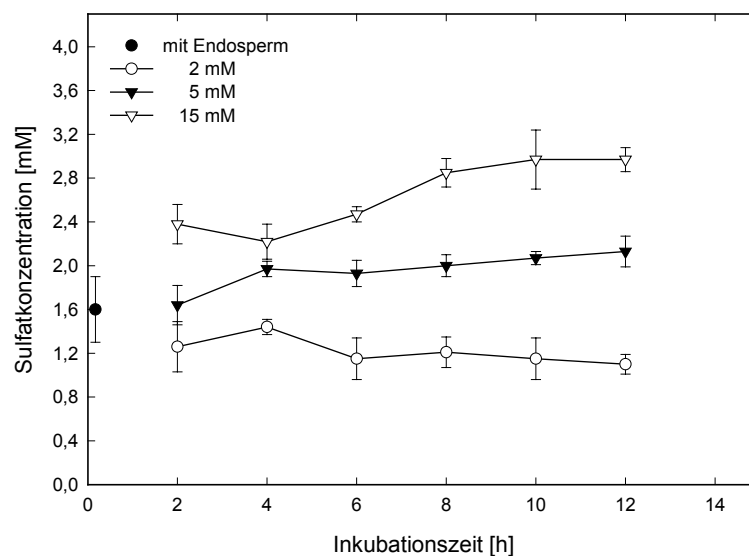


Abb. 3.5.3 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Sulfat im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten *Ricinus*keimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und Natriumsulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 25 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Bei Keimlingen mit Endosperm findet man im Siebröhrenexsudat Schwefel zu 40 % in organischer Form. Bei 60 % des im Phloem transportierten Schwefels handelt es sich um Sulfat (Komor *et al.*, 1996). Es kann die Frage gestellt werden, ob das Sulfatangebot den Transport von organischen Schwefelverbindungen verändert. Die Equilibrierung in 2 mM Sulfat führte zu einem 1:2-Transport von organischem Schwefel und Sulfat (n=6). Der Export aus den Keimblättern übertraf den durch Wuchsanalyse ermittelten Schwefelbedarf um ca. 1/3 (Tab. 1 Anhang). Erhöhte man die Sulfatkonzentration in der künstlichen Apoplastenlösung der Keimblätter veränderte sich der Export der organischen Schwefelverbindungen nicht. Organischer Schwefel wird im Phloem v.a. in Form von Glutathion, Methionin und Cystein transportiert. Der Transport von reduziertem Glutathion wurde bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben. Insgesamt gesehen kam es unabhängig vom externen Sulfatangebot zu einem kontinuierlichen Export organischer Schwefelverbindungen. Es wurde netto jedoch kaum Schwefel aus den Keimblättern exportiert (Abb. 3.5.2).

Tab. 3.5.1 Schwefel- und Sulfatkonzentration im Siebröhrenexsudat nach 8ständiger Inkubation der Keimblätter in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Zur Bestimmung der Schwefelkonzentration wurde das Exsudat von 5 Keimlingen zur Messung vereinigt. Es sind jeweils Mittelwert und Standardabweichungen angegeben (n=3). Die Konzentration des organisch gebundenen Schwefels wurde aus der Differenz zwischen Schwefel und Sulfat errechnet.

externe Bedingungen	Konzentrationen im Siebröhrenexsudat [mM]		
	Schwefel	Sulfat	organischer Schwefel
2 mM Sulfat	3,60 ± 1,01	1,21 ± 0,14	2,39
5 mM Sulfat	3,92 ± 0,75	2,00 ± 0,10	1,92
15 mM Sulfat	4,79 ± 1,09	2,85 ± 0,13	1,94

3.5.2.2 Gradienten zwischen Apoplast, Symplast und Phloem

Im folgenden Abschnitt wird auf die transmembranen Konzentrationsgradienten (Abb. 3.5.4) und die Akkumulationsfaktoren in Abhängigkeit vom apoplastischen Angebot (Tab. 3.5.2) eingegangen. Es kam zwischen der künstlichen Apoplastenlösung, den Keimblättern und dem Phloem zu einer Anreicherung von Sulfat. D.h. alle Kompartimente akkumulieren aktiv Sulfat aus dem Medium. Der Akkumulationsfaktor zwischen dem internen und dem externen Sulfat sanken mit zunehmender Sulfatkonzentration im Apoplasten (9 auf 2,4). Gleiches galt für das Verhältnis Phloem zu Medium (0,5 auf 0,2).

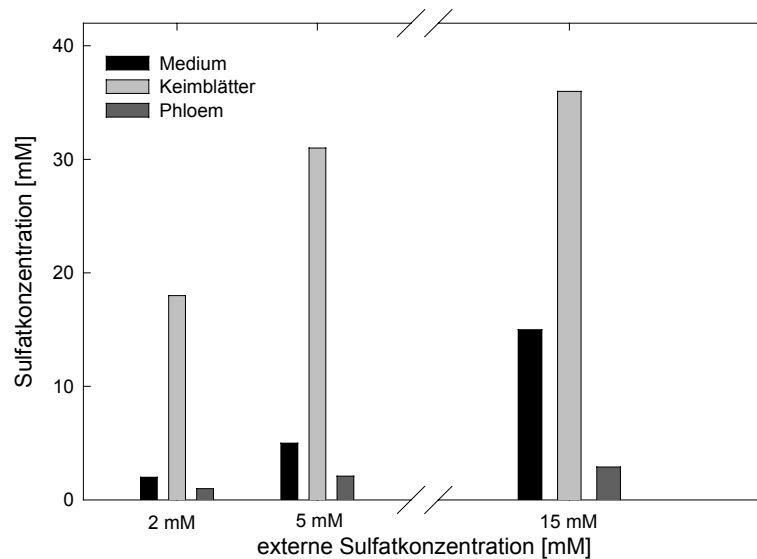


Abb. 3.5.4 Vergleich der *steady state*-Konzentrationen im Medium (künstliche Apoplastenlösung), in den Keimblättern und im Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter in 2 mM, 5 mM oder 15 mM Sulfat. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Sulfatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % berechnet.

Tab. 3.5.2 Akkumulationsfaktoren unter *steady state*-Bedingungen für Sulfat zwischen dem Medium (künstliche Apoplastenlösung), den Keimblättern und dem Siebröhrenexsudat nach Inkubation der Keimblätter in 2 mM, 5 mM oder 15 mM Sulfat. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Sulfatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % berechnet.

externe Bedingungen	Keimblätter	Siebröhrenexsudat
	Medium	Medium
2 mM Sulfat	9,0	0,5
5 mM Sulfat	6,2	0,4
15 mM Sulfat	2,4	0,2

3.5.2.3 Sulfat-Massenflußraten in Phloem und Xylem

Zur Quantifizierung einer möglichen Sulfatzirkulation wurde Wurzeldruckexsudat gewonnen. Von Interesse war zunächst die Wechselwirkungen zwischen der Substratkonzentration im Xylem mit dem apoplastischen Angebot. Auch im Wurzeldruckexsudat kam es in Abhängigkeit vom externen Sulfatangebot an den Keimblättern zu einer Veränderung der Sulfatkonzentration (Abb. 3.5.5). Während der Transfer in 5 mM Sulfat die Konzentration im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm nicht beeinflusste, nahm sie bei 15 mM Sulfat zu. 2 mM Sulfat reduzierte die Sulfatkonzentration des Wurzeldruckexsudats.

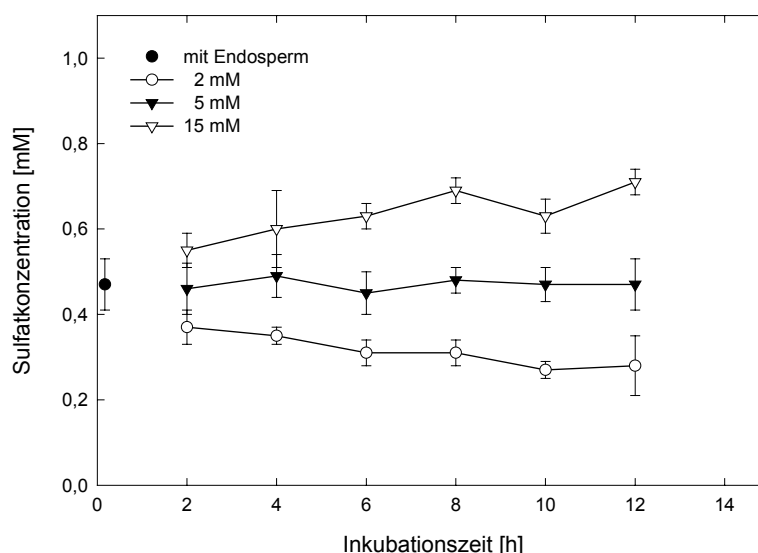


Abb. 3.5.5 Etablierung der *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Sulfat im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Keimblätter intakter Keimlinge für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Natriumsulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 30 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=3).

Die Flußrate im Phloem lag bei ca. 15 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$, im Xylem zwischen 36 und 55 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Ein Vergleich der Massenflußraten in Phloem und Xylem zeigte, daß Sulfat zirkuliert. Wie bereits im Abschnitt über den Stickstofftransport gezeigt, wurde reduziertes Glutathion nicht oder zumindest nicht in größeren Mengen im Xylem gefunden. Die Methioninkonzentration des Wurzeldruckexsudats war hingegen hoch (Keimlinge mit Endosperm).

Tab. 3.5.3 *Steady state*-Massenflußraten für Sulfat im Phloem und Xylem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen. Die Keimblätter intakter Keimlinge wurden für definierte Zeiträume in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5, 0,2 CaCl₂ und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Sulfat-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Phloem	Xylem
2 mM Sulfat	0,180 \pm 0,026	0,120 \pm 0,016
5 mM Sulfat	0,330 \pm 0,031	0,220 \pm 0,023
15 mM Sulfat	0,450 \pm 0,047	0,310 \pm 0,038

Die Sulfatmassenflußrate im Phloem übertraf in allen Fällen den durch Wuchsanalysen ermittelten Bedarf an Schwefel (Tab.1 Anhang). Es konnte gezeigt werden, daß das im Übermaß exportierte Sulfat zwischen Phloem und Xylem zirkuliert. Unabhängig von der apoplastischen Konzentration der Keimblätter kehren 70 % des exportierten Sulfats in den Apoplasten zurück. Eine frei Sulfatkonzentration von 5 mM im apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm ist wahrscheinlich, während die *in vivo*-Schwefelkonzentration bereits in den Seitenwänden der unteren Epidermis deutlich höher war.

3.5.2.4 Sulfataufnahme in die Keimblätter und symplastischer Efflux

Zur Bestimmung der unidirektionalen Aufnahme in die Keimblätter wurden die Keimblätter an intakten Keimlingen bis zur Etablierung der *steady state-Bedingungen* in unmarkiertem Medium vorinkubiert. Danach übertrug man die Keimblätter in eine radioaktiv-markiertes Sulfat enthaltende Lösung gleicher Konzentration. Die nach dieser Inkubation aufgenommene Radioaktivität wurde gemessen und der lineare Bereich ausgewertet. Durch umgekehrte Markierungsfolge wurde der Sulfatefflux aus den Zellen der Keimblätter quantifiziert (auch Abschnitt 2.7.1, 2.7.2 und Abschnitt 3.2.1.4).

Tab. 3.5.4 Unidirektionale Sulfataufnahme bzw. –efflux im *steady state* nach Inkubation der Keimblätter in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl₂ und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Wurzeln tauchten während dieser Zeit in 0,5 mM CaCl₂ ein. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=9).

externe Bedingungen	Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Aufnahme	Efflux
2 mM Sulfat	$0,24 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,02$
5 mM Sulfat	$0,45 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,03$
15 mM Sulfat	$0,52 \pm 0,12$	$0,09 \pm 0,03$

Es zeigte sich, daß die Aufnahme mit der externen Sulfatkonzentration anstieg, aber nicht linear (Tab. 3.5.4). Die hohe apoplastische Konzentration von 15 mM Sulfat führte zu einem geringeren Zuwachs als erwartet. Der Efflux aus dem Symplasten in den Apoplasten war eindeutig und durchaus höher als bei anderen Ionen (z.B. Phosphat) und bei allen Konzentrationen in einer Größenordnung von ungefähr 20 % der Aufnahme.

Die maximale Aufnahmekapazität in die Keimblätter wurde früh erreicht. Der Efflux betrug annähernd 20 % der Aufnahme. Er ist im Vergleich zu einigen anderen Substraten (Glutamin, Phosphat) hoch.

3.5.3 Sulfattransport nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten

Das Sulfat-Anion liegt entweder frei in der Bodenlösung oder absorbiert an Bodenkolloiden vor. In Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Verteilungszuständen ein. Dieses bestimmt letztlich die Verfügbarkeit für die Pflanze, d.h. die Aufnahme der freien Anionen durch die Wurzel. Um die Frage klären zu können, bei welcher Konzentration über die Wurzel dem Angebot über die Keimblätter vergleichbare Flüsse erzielt werden, wurden alle Substrate in hohen externen Konzentrationen an der Wurzel angeboten. Die Sulfatkonzentrationen im Wurzelmedium betrugen 2 mM, 5 mM und 15 mM. Die Keimblätter waren in dieser Zeit in einer Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 inkubiert.

3.5.3.1 Sulfattransport im Xylem und Import in die Keimblätter

Im Wurzeldruckexsudat zeigte sich, wie bei vielen der anderen untersuchten Elementen, eine deutliche Abhängigkeit vom externen Angebot (Abb. 3.5.6). Die Konzentration von Keimlingen mit Endosperm wurde in allen Fällen überschritten. Je höher die Sulfatkonzentration im Wurzelmedium, desto höher war auch Sulfatkonzentration im Wurzeldruckexsudat.

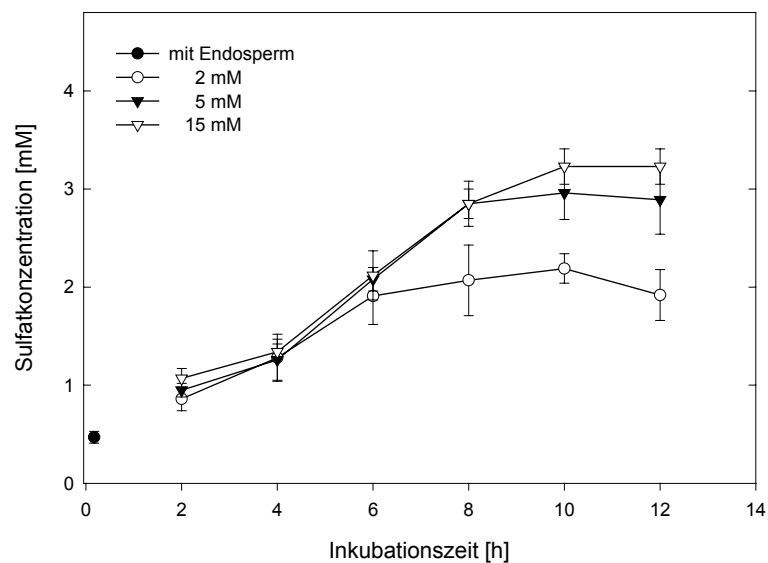


Abb. 3.5.6 Etablierung des *steady state* für die Konzentrationen von Sulfat im Wurzeldruckexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 1 mM MES(NaOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl_2 und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 30 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Um zu klären, was mit dem über das Xylem in die Keimblätter importierten Sulfat geschieht, wurde die Sulfatkonzentration und der Schwefelgehalt in den Keimblättern untersucht (Abb. 3.5.7).

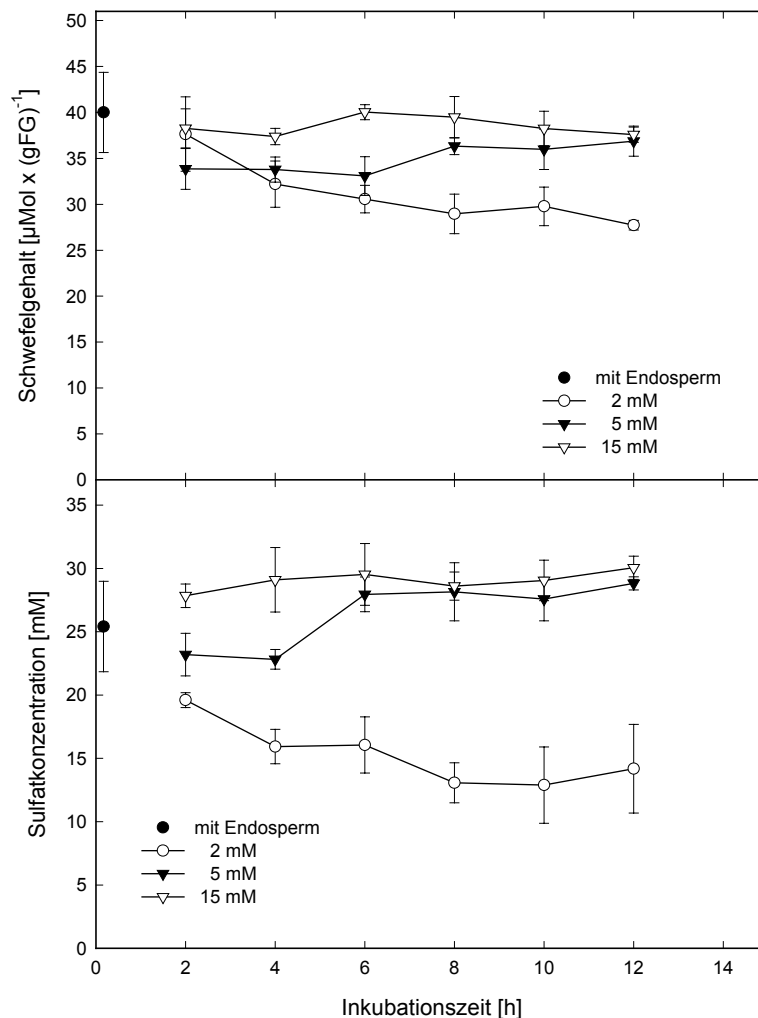


Abb. 3.5.7 Etablierung der *steady state*-Situation für die Schwefelgehalte und die Konzentrationen von Sulfat in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 1 mM MES(NaOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl_2 und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 ein. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Konzentration in den Keimblättern wurde aus dem Sulfatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Der Schwefelgehalt in den Keimblättern zeigte keine deutliche Abhängigkeit vom externen Angebot. Bei 5 und 15 mM Sulfat wurde der Gehalt von Keimlingen mit Endosperm erreicht, bei 2 mM wurde er um ca. 20 % unterschritten. Dies gilt als ein Anzeichen für einen kontinuierlichen Export von schwefelhaltigen Verbindungen. Die Sulfatkonzentration der Keimblätter ließ eine stärkere Abhängigkeit von der über die Wurzel angebotenen Sulfatmenge

erkennen. Auch hier unterschieden sich die beiden höheren Konzentrationen kaum, während 2 mM Sulfat die Sulfatkonzentration im Vergleich zu Keimlingen mit Endosperm annähernd halbierte.

3.5.3.2 Vergleich der Sulfatflüsse in Xylem und Phloem

Während 2 mM Sulfat die Sulfatkonzentration im Siebröhrenexsudat deutlich reduzierte, blieb sie bei 5 mM und 15 mM Sulfat hoch (Abb. 3.5.8). Die Konzentration von Keimlingen mit Endosperm wurde in diesen Fällen nicht unterschritten. Der Volumenfluß im Phloem schwankte unabhängig von den Inkubationsbedingungen zwischen 12 und $16 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$, im Xylem betrug er meist $48 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Die Sulfatmassenflußraten waren sowohl im Xylem als auch im Phloem gering. Der Massenfluß im Phloem betrug nur etwa 10 % des Massenflusses im Xylem (Tab. 3.5.5).

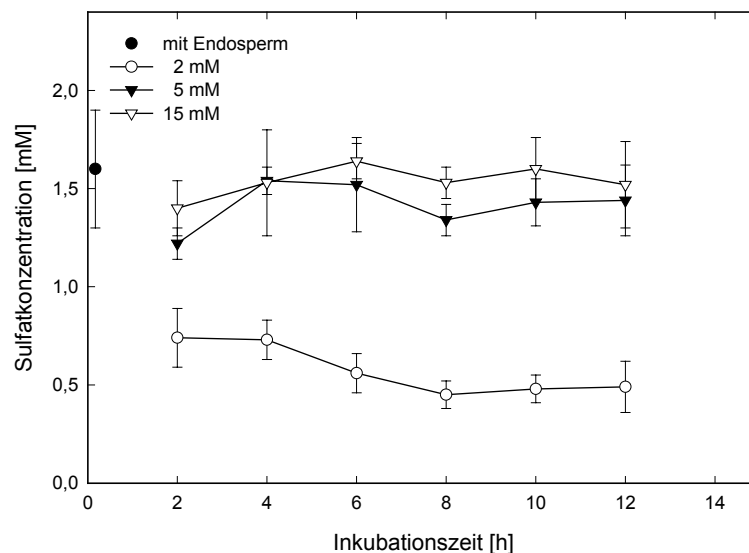


Abb. 3.5.8 Etablierung des *steady state*-Situation für die Konzentrationen von Sulfat im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 1 mM MES(NaOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl_2 und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in eine Lösung aus 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl_2 ein. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Hypokotyl zur Exsudatnahme angeschnitten. Die Exsudationszeit betrug 30 min. Als Vergleich dienten Keimlinge mit Endosperm. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=3$).

Tab. 3.5.5 *Steady state*-Massenflußraten für Sulfat im Xylem und Phloem von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen nach Inkubation der Wurzeln für definierte Zeiträume in 1 mM MES(NaOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl₂ und Sulfat in den angegebenen Konzentrationen. Die Keimblätter tauchten während dieser Zeit in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5 und 0,2 mM CaCl₂ ein. Es sind die Mittelwerte der jeweiligen *steady state*-Situation und die resultierenden Standardabweichungen angegeben (n=3x3).

externe Bedingungen	Sulfat-Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]	
	Xylem	Phloem
2 mM Sulfat	0,099 \pm 0,003	0,007 \pm 2 $\times 10^{-4}$
5 mM Sulfat	0,135 \pm 0,016	0,019 \pm 5 $\times 10^{-4}$
15 mM Sulfat	0,157 \pm 0,002	0,021 \pm 7 $\times 10^{-4}$

3.5.4 Vergleich des Langstreckentransports nach Equilibrierung über den Keimblatt- und den Wurzelapoplasten

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.5.6) sind die nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten und nach Equilibrierung über den Wurzelapoplasten erzielten Massenflüsse in Phloem und Xylem einander gegenübergestellt.

Tab. 3.5.6 Vergleich der *steady state*-Massenflüsse von Sulfat in Phloem und Xylem nach Equilibrierung über den Keimblattapoplasten oder über den Wurzelapoplasten.

externe Bedingungen	Equilibrierung über Keimblätter	Equilibrierung über Wurzel
	Phloem	Phloem
2 mM Sulfat	0,180 \pm 0,026	0,007 \pm 0,001
5 mM Sulfat	0,330 \pm 0,031	0,019 \pm 0,001
10 mM Sulfat	0,450 \pm 0,047	0,021 \pm 0,001
	Xylem	Xylem
2 mM Sulfat	0,120 \pm 0,016	0,099 \pm 0,003
5 mM Sulfat	0,220 \pm 0,023	0,135 \pm 0,016
10 mM Sulfat	0,310 \pm 0,038	0,157 \pm 0,002

3.5.5 Schwefelverteilung im Hypokotyl

Der Schwefelgehalt in den verschiedenen Abschnitten des Hypokotyls unterscheidet sich deutlich (Abb. 3.5.9). Während er im basalen Hypokotyl konstant war, kam es vom direkt an den Apex angrenzenden Teil bis hin zur Verdickungszone zu einem kontinuierlichen Absinken. Im apikalen Hypokotyl lag der Schwefelgehalt durchschnittlich zwischen 20 und 12 $\mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$, im basalen Hypokotyl nur noch bei ca. 7 $\mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$. Ein vergleichbares Bild ergab sich für sieben Tage alte Keimlinge. Das apikale Hypokotyl scheint, auf den Überlegungen von

Köckenberger (1995) basierend (Abschnitt 3.2.6), der Ort der größten Phloementladung von Schwefel zu sein.

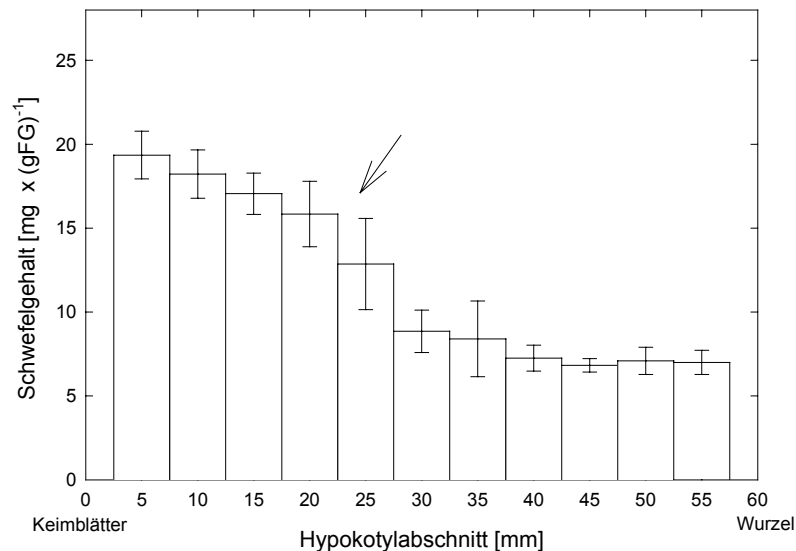


Abb. 3.5.9 Schwefelverteilung entlang des Hypokotyls von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen. Es wurden 5 mm lange Hypokotylabschnitte zur Bestimmung herangezogen. Die Lage der Verdickungszone ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen (n=6).

Für Keimlingen mit Endosperm wurde nach Wuchsanalyse ein für *normales Wachstum* erforderlicher Sulfatmassenfluß ermittelt. Er betrug $0,07 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ (Tab. 1 Anhang), für organische Schwefelverbindungen sogar leicht über $0,07 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$. Nach Equilibrierung der Keimblättern in sulfathaltigen Medien wurde dieser Massenfluß zumindest bei mittlerer und hoher apoplastischer Konzentration überschritten. Auch der Transport von organischen Schwefelverbindungen war deutlich erhöht.

3.5.6 Sulfatfluß in den Wurzelapoplasten

Bei keiner der untersuchten apoplastischen Konzentrationen konnte ein Sulfatfluß in den Wurzelapoplasten (Efflux) nachgewiesen werden. Falls dieser wirklich auftritt, ist er in seiner Größenordnung unter $0,5 \text{ nMol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimlingswurzel}^{-1}$. Es stellt sich die Frage nach dem Verbleib des exportierten Schwefels bzw. Sulfats. Wie durch die Analyse des Langstreckentransports gezeigt, zirkulieren große Mengen an ungenutztem Sulfat in der Pflanze, für die Schwefelversorgung werden anscheinend fast ausschließlich die im System vorhandenen organischen Schwefelverbindungen herangezogen. Schon früh ging man nicht nur in pflanzlichen Systemen davon aus, daß reduziertes Glutathion als Speicher- und Transportform von Schwefel dient (Rennenberg *et al.*, 1979; Leber-Zellen: Tateishi und Higashi, 1978). Eine Rezirkulation von Glutathion konnte nicht gefunden werden.

3.5.7 Wechselwirkungen zwischen der Sulfatkonzentration in den Keimblättern und der Schwefeltranslokation

Der unidirektionale Sulfatefflux aus dem Symplasten wurde nach Vorinkubation der Keimblätter an intakten Keimlingen in radioaktiv markiertem Sulfat bestimmt. Der Efflux zeigte eine Abhängigkeit von der apoplastischen Konzentration und ließ sich, wie die Aufnahme auch, nicht unendlich steigern. Extrapolierte man diesen symplastischen Efflux gegen die symplastische Konzentration, schneidet der Efflux die x-Achse nicht bei Null sondern bei ca. 15 mM (Abb. 3.5.10). Unter dieser intrazellulären Konzentration scheint es offenbar zu keinem weiteren Sulfatefflux aus den Zellen der Keimblätter zu kommen. Würde gleichzeitig auch der Nachschub aus dem apoplastischen Raum in den Blattapoplasten ausbleiben, müßte der Export zum Erliegen kommen.

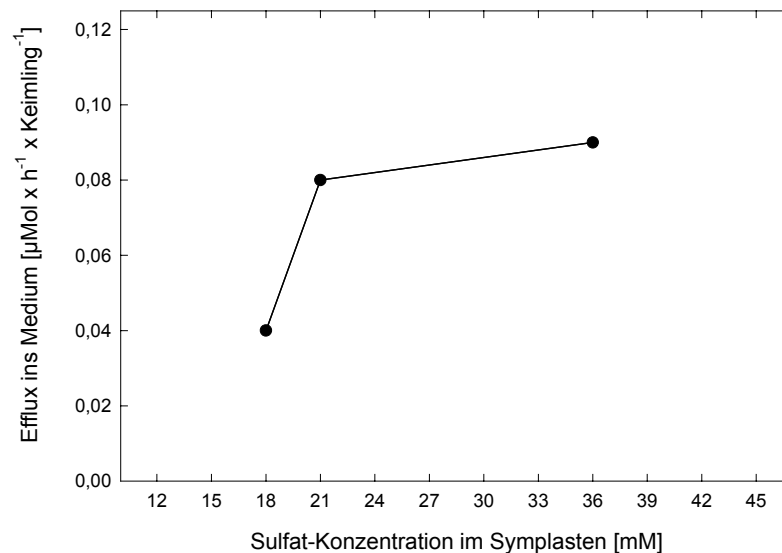


Abb. 3.5.10 Sulfatefflux aus dem Symplasten der Keimblätter sechs Tage alten Ricinuskeimlingen inkubiert in 100 mM Saccharose, 5 mM MES(NaOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und 0,5 mM, 2 mM und 10 mM Sulfat. Die symplastische Konzentration wurde aus dem Sulfatgehalt unter Berücksichtigung des Wasseranteils von 55 % errechnet.

3.5.7.1 Schwefeltransport nach fehlender apoplastischer Versorgung

Um detailliertere Erkenntnisse über die vermuteten untere Schwellenkonzentration für den Sulfatexport zu erhalten, wurde die Sulfatverteilung in Keimlingen nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms untersucht. Den Keimlingen wurde am Tag 3 das Endosperm abpräpariert anschließend wurden die einzelnen Organe zu definierte Zeiten geerntet und die Schwefelmenge quantifiziert. Die Exsudatgewinnung war in diesem Alter nicht möglich. Die errechnete Netto-Translokationsraten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf eine Stunde bezogen.

Die Keimblätter verloren zwischen Tag 3 und Tag 4 netto nur wenig Schwefel (Abb. 3.5.11). Die Translokationsrate war im Vergleich zu den inkubierten Keimlingen gering. Erstaunlicherweise geht auch aus dem Hypokotyl Schwefel verloren. Nach Tag 4 ergab sich eine Umkehr der Nettotransportrichtung. Sowohl in der Wurzel als auch im Hypokotyl reduzierte sich die Schwefelmenge. Besonders das Hypokotyl litt unter dem Nährstoffentzug. Das gleiche Bild ergab sich zwischen Tag 5 und Tag 6. Nur 50 % des Schwefels lagen in den Keimblättern in Form von freiem Sulfat vor. Der für den Sulfatexport geforderte untere Schwellenkonzentration von 15 mM wurde am Tag 4 mit 10,5 mM unterschritten.

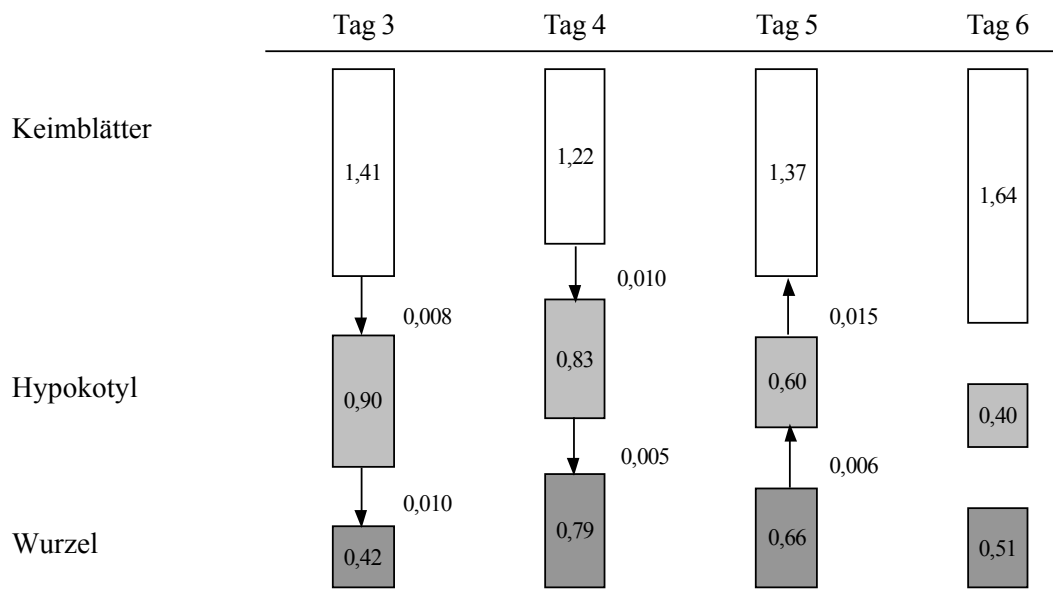


Abb. 3.5.11 Schwefelmenge [μMol] in den einzelnen Organen von Ricinuskeimlingen nach frühzeitiger Entfernung des Endosperms. Das Endosperm wurde am Tag 3 entfernt. Die Ernte der Gewebe erfolgte entweder am Tag 3, 4, 5 oder 6. Die Translokationsraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] wurden aus dem Zuwachs der verschiedenen Organe errechnet. Sie sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Es sind jeweils Mittelwerte angegeben ($n \geq 4$).

3.5.7.2 Abhängigkeit vom Alter der Keimblätter

Auch in diesem Abschnitt stand die Frage im Mittelpunkt, ob dieser für den Sulfatexport geforderte untere Schwellenkonzentration wirklich existiert. Es wurden Keimblätter mit sulfathaltiger Nährlösung versorgter Pflanzen untersucht. Der Schwefelgehalt bei optimaler Ernährung nahm über den Versuchszeitraum kontinuierlich zu (Abb. 3.5.12). Bis zum Tag 24 kam es zu einer Anreicherung um den Faktor 5. Auch die Konzentration an freiem Sulfat stieg proportional mit dem Schwefelgehalt an (von ca. 100 auf ca. 600 $\mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$). Die Keimblätter akkumulierten bei guter Versorgung der Pflanze mit dem Alter Schwefel. Auch in den Keimblättern der Pflanzen, die bis zum Tag 14 auf den Anzuchtstöpfen verblieben, kam es

erstaunlicherweise zu einem leichten Anstieg des Schwefelgehaltes (von ca. 90 auf 120 $\mu\text{Mol} \times (\text{gFG})^{-1}$). Wiederum lagen ca. 50 % als Sulfat vor.

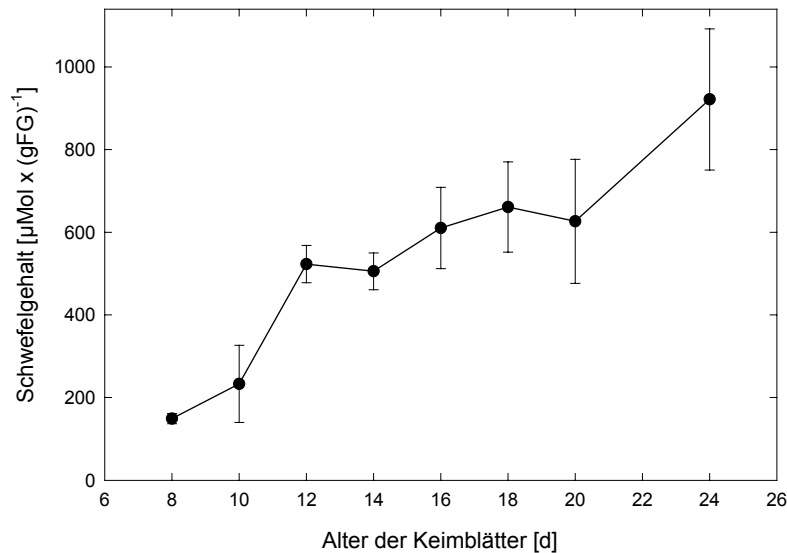


Abb. 3.5.12 Abhängigkeit des Schwefelgehalts vom Alter der Keimblätter. Die Ricinuspflanzen wurden nach dem sechsten Tag in die Klimakammer transferiert. Die Ernährung der Pflanzen erfolgte ab Tag 7 mit schwefelhaltiger Nährlösung. Die Balken repräsentieren Standardabweichungen ($n=6$).

3.6 *Myo*-Inositol, Natrium und Bor

Das Testsystem *Ricinuskeimling* kann gezielt dazu benutzt werden, Wechselwirkungen zwischen der apoplastischen Substratkonzentration und dem Fernstreckentransport zu untersuchen. Man kann Stoffe sowohl über die Keimblätter als auch über die Wurzel anbieten. *Myo*-Inositol steht in einem engen Bezug zu Vorgängen wie *cell signaling*, Membranbiogenese, aber besonders auch Salinität. Es ist im extrazellulären Raum fast aller Lebewesen beweglich (Garcia-Perez und Burg, 1991). Seine Bewegung scheint jedoch streng reguliert. Basierend auf den Ergebnissen von Nelson *et al.* (1998) wurde *myo*-Inositol an den Keimblättern und Natrium über die Wurzel angeboten. Ziel dieser Versuche war es, die Interaktion zwischen der apoplastischen Konzentration, dem *myo*-Inositol-Transport über das Phloem und dem Natriumtransport über das Xylem zu untersuchen (die *myo*-Inositol-Analytik wurde von M. Rice (University of Tucson, Arizona USA) durchgeführt).

Tab. 3.6.1 *myo*-Inositol-* und Natrium-Konzentrationen in den Keimblättern bzw. Inositol-Massenflußraten im Phloem nach Inkubation von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen mit Inositol über die Keimblätter oder Natriumchlorid über die Wurzel (Inkubationsbedingungen vgl. Tab. 3.2.8). Die Inkubationszeit betrug 6, 8 und 10 Stunden. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben; n.a. = nicht analysiert (n≥10).

Inkubationsmedium	Konzentrationen [mM]	Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]
	Keimblätter	Phloem
1 mM Inositol	$11,53 \pm 2,52^*$	$0,18 \pm 0,02$
5 mM Inositol	$26,93 \pm 2,20^*$	$0,30 \pm 0,02$
10 mM Inositol	$32,14 \pm 1,13^*$	$0,46 \pm 0,11$
25 mM Inositol	n.a.	$0,52 \pm 0,17$
10 mM NaCl	$1,08 \pm 0,19$	n.a.
50 mM NaCl	$2,04 \pm 0,18$	n.a.

Keimlinge mit Endosperm enthielten ungefähr 3 mM *myo*-Inositol in ihren Keimblättern, der Phloemfluß war mit $0,05 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ gering. Durch Equilibrierung des Keimblattapoplasten in unterschiedlichen Konzentrationen von Inositol konnte die Konzentration in den Keimblättern signifikant erhöht werden (Tab. 3.6.1). Der Fluß im Phloem stieg weder proportional zur apoplastischen noch zur Konzentration in den Keimblättern. Pinitol und Ononitol wurden nicht gefunden. Auch bei gleichzeitiger Versorgung mit Inositol (über die Keimblätter) und Natrium (über die Wurzel) fand man einen erheblichen Transport von Inositol im Phloem (Tab. 3.6.2), jedoch bestanden keine signifikante Unterschiede zum Transport in Abwesenheit von Natrium. Die Natriumkonzentration in den Keimblättern lag in allen Fällen bei durchschnittlich 1,2 mM. Sie zeigte folglich keine Abhängigkeit vom externen Inositolangebot (Tab. 3.6.2) und nur einen geringen Unterschied zur Situation ohne zusätzliches Inositol.

Tab. 3.6.2 Abhängigkeit der *myo*-Inositolkonzentrationen und der Inositol-Massenflußraten von den Inkubationsbedingungen. Keimblätter intakter Keimlinge wurden für definierte Zeiträume in 5 mM MES(KOH) pH 5,5, 0,2 mM CaCl_2 und *myo*-Inositol in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, während die Wurzeln in 1 mM MES(KOH) pH 5,0, 0,5 mM CaCl_2 und 10 mM NaCl eintauchten. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n≥5).

Inkubationsmedium der Keimblätter	Konzentrationen [mM]	Massenflußraten [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$]
1 mM Inositol 6h	$16,55 \pm 8,25$	$0,22 \pm 0,07$
1 mM Inositol 8h	$9,47 \pm 3,38$	$0,25 \pm 0,05$
1 mM Inositol 10h	$13,57 \pm 5,20$	$0,27 \pm 0,05$
5 mM Inositol 10h	$29,65 \pm 9,64$	$0,35 \pm 0,15$
10 mM Inositol 6h	$26,49 \pm 10,17$	$0,42 \pm 0,09$
10 mM Inositol 8h	$31,85 \pm 5,98$	$0,41 \pm 0,09$
10 mM Inositol 10h	$27,48 \pm 0,43$	$0,43 \pm 0,16$

Trotz der Fähigkeit der Keimlinge Natrium unter moderaten Bedingungen auf dem Weg in die Blätter effektiv aus dem Xylem zu entladen und in der Rinde und der Epidermis des Hypokotyls zu akkumulieren (Olt *et al.*, 2000), gelangt ein Teil des transportierten Natriums bis in die Keimblätter. Von dort ausgehend kann es wieder ins Phloem beladen werden (Wolf und Jeschke, 1988). Die Natriumaufnahme über die Wurzel und der Natriumtransport im Xylem zeigten, entgegen der Hypothese von Nelson *et al.* (1999), keine Wechselwirkung zum Inositolexport aus den Keimblättern. Die Natriumkonzentration in den Keimblättern müßte ansonsten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit steigen. Dies trat nicht ein. Möglich ist, daß der Inositolstatus der Wurzel bzw. der Phloemtransport negativ auf die Natriumaufnahme zurückkoppelt. Desweiteren kann es sein, daß Natrium, erst einmal in die Keimblätter gelangt, nicht in den Symplasten aufgenommen, sondern direkt ins Phloem beladen wird. Natrium ist phloemmobil, und der Phloemtransport wird durch die apoplastische Konzentration beeinflusst (Zhong *et al.*, 1998).

Inositol kommt, wie gezeigt, sowohl in den Keimblättern als auch im Siebröhrenexsudat vor, es könnte als Partner für den Transport von Bor im Phloem dienen. Bor kann Komplexe mit Schiffschen Basen aber auch mit Polyolen bilden (Blevins und Lukaszewski, 1998). An Sorbitol gebunden wird es z.B. in *Rosaceen* translokiert (Bellaloui *et al.*, 1999). Im Siebröhrenexsudat von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen wurde Bor in einer Konzentration von 30 bis 110 μM gefunden (Messungen von M. Wimmer, Universität Bonn). Diese Konzentration ist deutlich höher als die Inositolkonzentration (Verhältnis:10:1). Zum Bortransport im Phloem des Ricinuskeimlings müssen somit zusätzlich oder ausschließlich andere Verbindungen als Partner dienen.

4 *Diskussion*

Die Apoplastenlösung des Blattes und der Wurzel sind Ausgangs- und Endpunkt einer Vielzahl von Nährstoffflüssen, die in engem Zusammenhang zueinander stehen. Ziel dieser Arbeit war es, die kinetischen Wechselwirkungen zwischen den Substratflüssen im Blattapoplasten und dem Fernstreckentransport in Phloem und Xylem zu messen und zu bilanzieren. Als Versuchsobjekt diente dabei der sechs Tage alte Keimling von *Ricinus communis* L.. Untersucht wurden die Elemente und Ionen Kohlenstoff, insbesondere Saccharose, Stickstoff (Glutamin), Kalium, Phosphat und Sulfat. Bislang wurden diese Wechselwirkungen v.a. am dauerexsudierenden Keimling beschrieben (besonders detailliert von Zhong, 1994). Man inkubierte zunächst intakte Keimlinge über einen relativ kurzen Zeitraum (meist 3 Stunden), schnitt sie danach zur Probenahme an und sammelte über einige Stunden hinweg Exsudat. Dabei kam es zu einer zeitabhängigen Veränderung der Substratkonzentration im Exsudat, gleiches traf auf die Volumenflußraten zu. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß zur Equilibrierung des intakten Systems (nach Veränderung der externen, apoplastischen Konzentrationen) Inkubationszeiten von bis zu 8 Stunden notwendig sind. Um diese neue *steady state*-Bedingungen zweifelsfrei dokumentieren zu können, ist des weiteren eine kurze Exsudationszeit erforderlich (Abschnitt 3.1.2). Zur Quantifizierung einer potentiellen Zirkulation zwischen Phloem und Xylem wurde eine neue Methode zur Gewinnung von Wurzeldruckexsudat entwickelt. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß sie den *in vivo*-Bedingungen (Köckenberger *et al.*, 1997) vergleichbare Volumenflußraten liefert, v.a. aber durch einen geringen Grad der Verunreinigung des Wurzeldruck- mit Siebröhrenexsudat (Abschnitt 3.1.3).

4.1 Saccharose als Hauptkomponente des Kohlenstoffertrnsports

4.1.1 Wechselwirkung zwischen der apoplastischen Saccharosekonzentration und dem Kohlenstoffhaushalt in den Keimblättern und im apikalen Hypokotyl

In Abb. 4.1 ist zu erkennen, daß die Keimblätter Saccharose in Abhängigkeit vom externen, apoplastischen Angebot an den Keimblättern akkumulieren. Bick *et al.* (1998b) zeigten, daß das Transskript des *RcSUT1*-Genes, das einen Saccharosecarrier kodiert, v.a. in der unteren Epidermis der Ricinuskeimblätter auftritt. Ferner konnten sie eine für Transferzellen übliche Ausbildung der Zellwand und eine hohe Anzahl von Plasmodesmen zwischen unterer Epidermis und dem angrenzenden Parenchym feststellen. Ein großer Teil der aus dem apoplastischen Raum stammenden Saccharose wird offenbar aktiv vermutlich über die Membranen der unteren Epidermis in den Symplasten aufgenommen. Ein Teil diffundiert aber sicherlich direkt in den

Apoplasten der Keimblätter. Der Export der im Überschuß in die Keimblätter aufgenommenen externen Saccharose erfolgt über das Phloem. Die Beladung des Phloems an sich ist schon frühzeitig gesättigt (Abb. 4.1). Das adulte Ricinusblatt wurde von Gamalei (1991) als Typ 1-2a, somit als apoplastisch beladend, klassifiziert. Wie Orlich und Komor (1992) zeigen konnten, wird im Keimling mindestens die Hälfte der Saccharose direkt aus dem Apoplasten ins Phloem beladen, ein weiterer Teil auf einem als *indirekt apoplastische Phloembeladung* bezeichneten Weg. Die Möglichkeit der symplastischen Beladung des Phloems über Plasmodesmen besteht ebenfalls (Orlich *et al.*, 1998). Der Efflux aus den Zellen der Keimblätter steigt mit der apoplastischen Konzentration. Er kann bis zu 35 % der Aufnahme ausmachen, die dafür verantwortlichen *Efflux*-Transporter wurden bislang nicht gefunden (Ward *et al.*, 1998).

Unabhängig vom externen Angebot werden 70 % der in die Keimblätter aufgenommenen Saccharose über das Phloem in den *sink* exportiert. 30 % der Aufnahme bleiben in den Keimblättern und dem apikalen Hypokotyl zurück, das aufgrund der Exsudatnahme dem *source* zugerechnet wird und den Ort der größten Saccharoseentladung darstellt. Die intrazelluläre Stärkespeicherung wird von der apoplastischen Saccharosekonzentration kaum beeinflusst (Abschnitt 3.2.7).

4.1.2 Ferntransport von löslichen Zuckern

Bei adäquatem Angebot im Apoplasten der Keimblätter konnte keine Saccharose im Wurzeldruckexsudat gefunden werden (Abschnitt 3.2.3). Es kommt unter diesen Bedingungen zu keiner *short term*-Zirkulation von Saccharose im Keimling. Widersprüchliche Befunde, z.B. von Schobert und Komor (1990) und Köckenberger (1995), resultieren aus der unterschiedlichen Methode zur Gewinnung des Wurzeldruckexsudats (Abschnitt 3.1.3) oder auf der unwahrscheinlichen Annahme, daß der Eintransport in die Wurzel eine Konzentration von 300 mM Saccharose übersteigt. Im basalen Hypokotyl (1 cm oberhalb der Wurzel) werden im Siebröhrenexsudat nur Konzentrationen von ca. 200 mM Saccharose erreicht (Verscht *et al.*, 1998).

Auch der Xylem- bzw. Rücktransport von Hexosen war gering und nur mäßig durch das apoplastische Saccharoseangebot beeinflussbar. Das Auftreten der Hexosen scheint durch die intrazelluläre Spaltung der angelieferten Saccharose und ein unspezifisches *Lecken* ins Xylem bedingt, da die Saccharoseentladung in der Wurzel auf symplastischen Wege erfolgt (Chapleo und Hall, 1989). Trotzdem kann man davon ausgehen, daß auch ein kleiner apoplastischer Pool an Zuckern vorhanden ist. Die Gefahr des Saccharoseverlustes aus dem extrazellulären Raum besteht aber kaum. Auch die Fähigkeit zum *Saccharose-retrieval*, allgemein ein aktiver Prozeß (Chin *et al.*, 1981), ist vernachlässigbar (Abschnitt 3.2.6).

Obwohl relativ hohe Konzentrationen an organischem Kohlenstoff im Xylem, speziell von Bäumen (Sato *et al.*, 1992; Voitsekhovskaja *et al.*, 2000), gefunden wurden, befassen sich nur wenige Studien mit einer potentiellen Zirkulation von Saccharose bzw. Zuckern über Phloem und Xylem. Dies ist erstaunlich, da Cataldo *et al.* (1988) davon ausgehen, daß es sich bei 15 % der im Xylem transportierten organischen Verbindungen um Zucker handelt. Ein merklicher Zuckertransport konnte bislang jedoch nur vor der Blütenentfaltung in *Zea mays* (5 mM Zucker; Canny und Mc Cully, 1989) und bei Bäumen (s.o.) vor dem Blattaustrieb im Frühjahr

nachgewiesen werden. Bei diesen Pflanzen kommt es in Zeiten eines überdurchschnittlichen Energiebedarfs zu einer Mobilisierung von Zuckerspeichern und zu einer *long term*-Zirkulation von Zuckern. Bei vielen anderen Pflanzen, wie z.B. adulten Ricinuspflanzen (Schurr, 1991; auch Abschnitt 3.2.5), wurden die Kohlenhydrate zwar in die Analysen des Xyleminhaltes einbezogen, ihre Konzentration lag aber meist unter der Nachweisgrenze oder waren vernachlässigbar (Abb. 4.1). Einzig Heizmann *et al.* (2001) fanden vor kurzem eine *short term*-Zirkulation von Zuckern in *Quercus robur*.

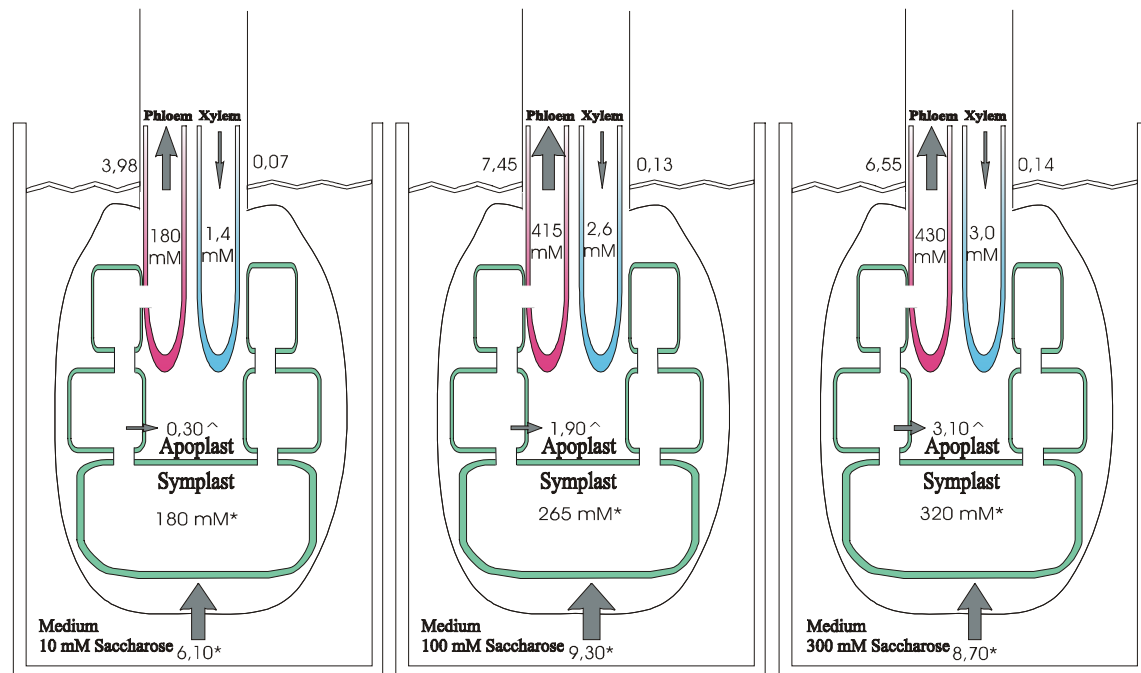


Abb. 4.1 *Steady state*-Flüsse der Saccharose in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen in Abhängigkeit von der externen, apoplastischen Konzentration. Es sind die Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] zwischen dem Blattapoplasten, dem Blattgewebe, dem Phloem und dem Xylem angegeben. Sie sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *steady state*-Konzentrationen [mM] sind angegeben. * nach Orlich (1998); ^ nach Orlich (unveröffentlicht).

4.2 Ferntransport stickstoffhaltiger Verbindungen

4.2.1 Glutaminaufnahme in die Keimblätter und der Weg zum Phloem

Externes Glutamin wird aktiv sowohl in den Keimblättern als auch im Phloem aufgenommen (Abschnitt 3.2.1.1), jedoch mit unterschiedlichen Raten (Abschnitt 3.2.1.2). Der Konzentrationsgradient zwischen Exsudat und Medium zeigt, daß bei niedriger apoplastischer Konzentration der Fluß vor allem in den Ferntransport läuft. Es scheint, daß der/die Glutamincarrier am Phloem wesentlich aktiver sind als der/die Carrier am Mesophyll. Demonstriert wurde die Aktivität von Aminosäurecarriern erstmals von Bush (1993). Seit dieser Zeit fand man bislang drei verschiedene Gruppen von Aminosäure-Transporter-Genen v.a. aus *Arabidopsis*

thaliana. Es handelt sich dabei um: 1.) die AAPs (amino acid permease), 2.) den ProTs (proline transporter) und 3.) AUX1 (auxin resistance). Die Familie der AAPs wird aufgrund von Unterschieden in ihrer Substratspezifität in zwei Unterfamilien eingeteilt. Es gibt Transporter ohne Spezifität, d.h. sie können alle Aminosäuren transportieren, aber auch welche, die bevorzugt neutrale und saure Aminosäuren erkennen. Diese Familie enthält in *Arabidopsis* mindestens 7 Mitglieder (Kwart *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 1995; Rentsch *et al.*, 1996; Rentsch *et al.*, 1998). Die zweite Gruppe beinhaltet Transporter, die bevorzugt Prolin transportieren (Rentsch *et al.*, 1996), die dritte wird durch einen putativen Indolelessigsäure-Transporter gebildet (Bennett *et al.*, 1996). Aus *Ricinus communis*-Keimlingen wurde die cDNA zweier vermeintlicher Aminosäuretransporter (RcAAP1 und RcAAP2) isoliert (Bick *et al.*, 1998a). Beide sind in großer Menge in den Keimblättern und der Wurzel expremiert, weniger im Endosperm. *In situ*-Hybridisierung ergab für RcAAP1 eine hohe Expression in Zellen nahe des Wurzelxylems.

4.2.2 Glutaminzirkulation zwischen Phloem und Xylem

Durch die Quantifizierung der Wechselwirkungen zwischen dem apoplastischen Glutaminangebot und dem Langstreckentransport konnte gezeigt werden, daß Glutamin rege in der Pflanze zirkuliert (Abb. 4.2). Bei mittlerer und hoher apoplastischer Konzentration kommt es zu einem 1:1-Transport von Glutamin über Phloem und Xylem. Auch Schobert (1988) wies nach, daß der Keimling in diesem Alter mehr N im Phloem transportiert, als er für sein Wachstum benötigt. Für die Deckung des Stickstoffbedarfs im *sink* dienen folglich andere organische N-Verbindungen außer Glutamin, wobei man davon ausgehen kann, daß es sich vor allem um Purin- und Pyrimidinbasen handelt (Abschnitt 3.2.2). Interessanterweise geht Köckenberger (1995) aufgrund seiner Modellierung des N-Transports entlang des Hypokotyls davon aus, daß die Glutamintranslokationsrate ortsabhängig ist. Die maximale Rate ergibt sich für das Phloem nahe des Apex, im Bereich der Verdickungszone (dem Ort der Exsudatnahme) ist sie mit $1 \mu\text{Mol Glutamin} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ bereits reduziert. Die nach Equilibrierung in 10 mM Glutamin gemessene Massenflußrate entspricht somit der vermeintlichen *in vivo*-Translokationsrate. Zusätzlich wird deutlich, daß es durch den Abbau von organischen N-Verbindungen zu einer Freisetzung von Glutamin im *sink* kommt. Dies ist nicht erstaunlich, da schon früh darauf hingewiesen wurde, daß die Zusammensetzung des Xyleminhaltes nicht anders gesteuert werden kann, als durch die Bedingungen der Stoffaufnahme und der -entnahme während des Transportes nach oben (Biddulph *et al.*, 1958). Atkins (2000) konnte zeigen, daß es bei Lupinen zu einer Akkumulation von Asparagin entlang des Xylemweges kommt. Desweiteren geht Atkins (2000) von einem Xylem-Phloem-Transfer des über den Transpirationsstrom in die Blätter importierten Asparagins aus. Gleiches scheint auf den Glutamintransport im Ricinuskeimling zuzutreffen (s.u.).

Ein weiteres Phänomen, das die Bedeutung der apoplastischen Verfügbarkeit und somit der apoplastischen Substratkonzentration zeigt, wurde von Schobert und Komor (1989) beschrieben. Sie verglichen das Exsudat aus mit Endosperm exsudierender Keimlinge und demjenigen nach 2 Stunden Inkubation und anschließender einstündiger Exsudation ohne Substratzufuhr (Inkubation in Puffer). Die Aminosäurekonzentration in den nun nicht mehr an die Vorgänge im *sink* gekoppeltem System (fehlende *sink*-Limitierung) sank von 157,6 mM auf 16,4

mM ab, wobei v.a. die auf apoplastischem Wege beladenen Aminosäuren (z.B. Glutamin) betroffen waren.

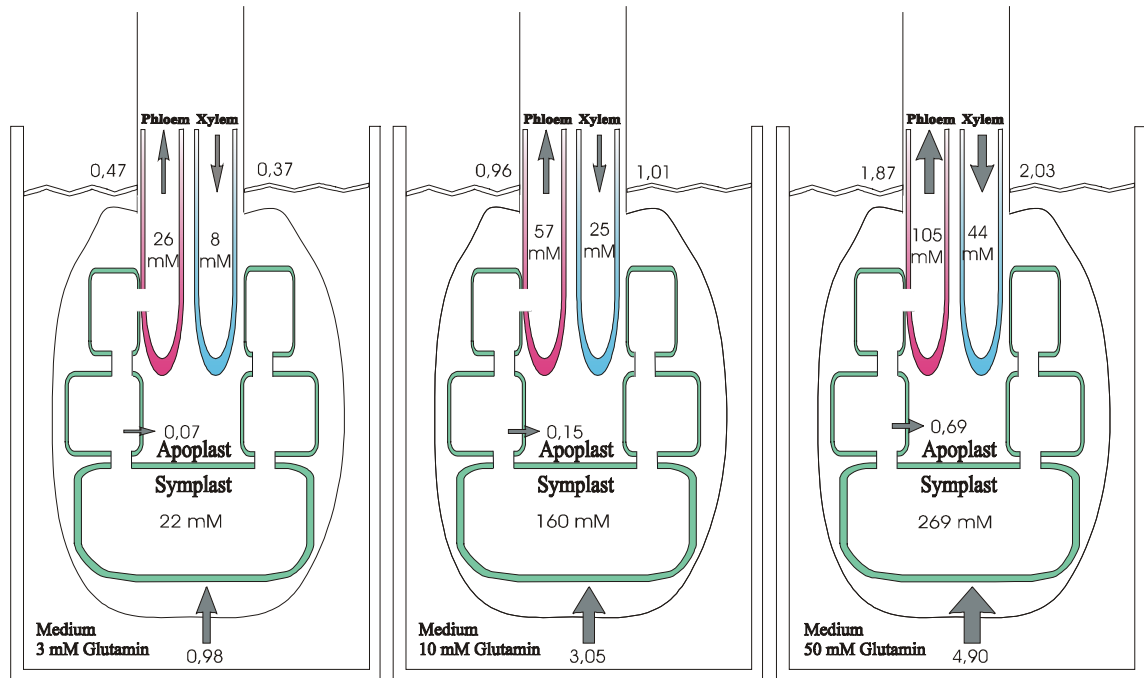


Abb. 4.2 *Steady state*-Flüsse des Glutamins in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen in Abhängigkeit von der externen, apoplastischen Konzentration. Es sind die Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] zwischen dem Blattapoplasten, dem Blattgewebe, dem Phloem und dem Xylem angegeben. Sie sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *steady state*-Konzentrationen [mM] sind angegeben.

4.2.3 Nitrattransport im Xylem und Reduktion in der Wurzel

Nach Transfer der Wurzel in nitrathaltiges Medium, war kaum Nitrat im Wurzeldruckexsudat und in den Keimblättern nachweisbar. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Peuke und Jeschke (1993), die fanden, daß es sich nach Nitratangebot an der Wurzel bei 74 % der N-haltigen Verbindungen im Xylem um Nitrat handelt (auch Allen und Raven 1987; Van Beusichem *et al.*, 1988; Schurr, 1991). Alle diese Untersuchungen wurden jedoch an adulten Ricinuspflanzen durchgeführt. Die Glutaminkonzentration im Xylem übertraf parallel dazu diejenige der Keimlinge mit Endosperm deutlich. Das Schlüsselenzym zur Bildung von reduzierten, N-haltigen Verbindungen ist das Enzym *Nitratreduktase*. Dieses Enzym kann in verschiedenen Formen in den Blättern aber auch in der Wurzel von Pflanzen gefunden werden, wobei jeweils zwischen einer konstitutiven und einer induzierbaren Aktivität dieses Enzyms unterschieden wird (Clarkson, 1985; Abschnitt 3.2.4). Die hohe Glutaminkonzentration im Wurzeldruckexsudat (z.B. nach 2 Stunden) läßt vermuten, daß die Reduktion großer Teile des Nitrats bereits in der Wurzel erfolgte. Auch Jeschke und Pate (1991b) gehen davon aus, daß in Ricinuspflanzen Nitrat v.a. in der Wurzel reduziert wird (51 %). Eine *feedback*-Regulation zwischen Nitrat- und Glutaminflüssen, wie von Tillard *et al.* (1998) vermutet, ließ sich nicht erkennen.

Durch *pulse chase*-Versuche läßt sich zeigen, daß ein Großteil des importierten Stickstoffs direkt nach Eintrag in die Keimblätter aus dem Apoplasten oder nach Umweg über Transferzellen (*scavenging*: Canny, 1988; Atkins, 2000) ins Phloem beladen und wieder aus den Keimblättern exportiert wird (Abschnitt 3.2.4.3). Auch Hayashi *et al.* (1997) fanden im Rahmen von Experimenten mit ^{15}N , das über die Wurzel angeboten wurde, nach 10 min Markierung im Phloem. Die Phloembeladung an sich scheint sehr schnell zu erfolgen.

4.2.4 Zusammenspiel von Kohlenstoff und Stickstoff bei der Phloembeladung aus dem Apoplasten

Der Ricinuskeimling zeigt eine für Pflanzen typische C- und N-Verteilung. In den Keimblättern findet sich der höchste Stickstoffanteil, ein niedriger im Hypokotyl und der Wurzel. Dieses Verhältnis änderte sich nur wenig, wenn das Endosperm entfernt wird. Es kommt jedoch zu einem frühen Erliegen des Netto-C-Transport (Abschnitt 3.2.9), gleichzeitig erfolgt weiterhin ein Nettoexport von N aus den Keimblättern (Abschnitt 3.2.10). Der gegenläufige C-Import kann nicht durch Zucker getragen werden sondern läßt auf eine übermäßige Translokation von organischen Säuren schließen. Ihre Bildung und ihr Transport wird üblicherweise durch Trockenheit gefördert (Schurr, 1991; Patonnier *et al.*, 1999). Die Wurzel dieser Keimlinge war durch den Substratzug nur mangelhaft ausgebildet, die Wasseraufnahme könnte erschwert sein.

Erstaunlich ist die Tatsache, daß es, trotz des anscheinend erheblichen C-Mangels (fehlende externe Zufuhr), zu keiner vollständigen Mobilisierung der Kohlenhydratreserven kommt (Tab. 3.2.17). Mittlerweile besteht die einhellige Meinung, daß Saccharose nicht nur als Substrat für den Stoffwechsel dient sondern auch spezifisch Gene aktiviert und reprimiert (Lalonde *et al.*, 1999). Diese Gene werden in zwei Kategorien eingeteilt (*feast* und *famine-responses*; Koch, 1996). Kohlenhydratmangel stimuliert allgemein die Photosynthese aber auch Gene, die für die Mobilisierung von Speichern verantwortlich sind. Ansteigende Zuckerkonzentrationen wirken auf Gene zur Nutzung und vermehrten Speicherung (Koch, 1996), wobei in beiden Fällen nicht nur intrazelluläre Enzyme sondern auch Membran-Transporter als Sensor dienen. Es ist jedoch bekannt, daß ein Mangel an apoplastischen Zuckern, die Aktivität des Saccharose-Transporters SUT1 verringert (Chiou und Bush, 1998). Die Expression von *SUT1* wird sowohl auf dem mRNA- als auch dem Protein-Level reguliert (Kühn *et al.*, 1997).

Stickstoff- und Zuckermetabolismus konkurrieren in mehrerlei Hinsicht um die aus der Photosynthese hervorgehenden C-Skelette (Scheible *et al.*, 1997; Oliveira und Coruzzi, 1999). Eine Koordination beider Prozesse ist notwendig. Man geht von einer Regulation über den TCA-Zyklus und den Stärkemetabolismus aus. Nitrat spielt dabei eine Schlüsselrolle (Pouteau *et al.*, 1989; Hoff *et al.*, 1994). Desweiteren reagiert auch die apoplastische Aminosäurebeladung über die Aktivität der Aminosäurepermeasen auf die extrazelluläre Aminosäurekonzentration (Hein *et al.*, 1995; Thorens, 1996). Zusätzlich wird zumindest der C-Stoffwechsel durch verschiedenen Hormone beeinflusst (Hellmann *et al.*, 2000).

Für die Situation in den Keimlingen, denen das Endosperm frühzeitig entfernt wurde, bedeutet dies, daß die apoplastische Phloembeladung von Saccharose und einiger Aminosäuren durch das Fehlen der Substrate vermindert wird bzw. durch den fehlende Efflux aus dem

Symplasten ganz ausbleibt (untere Schwellenkonzentration für Saccharose). Die Aktivität der Transporter an den SR bzw. dem SRGZ-Komplex und der Massenfluß im Phloem, der v.a. durch den Saccharosetransport bedingt ist (Winter *et al.*, 1992), wird auf ein Minimum reduziert. Anders verhält es sich mit dem symplastischen Export, einem auf Diffusion basierenden Vorgang. Dieser Beladungsweg ist für eine Vielzahl von stickstoffhaltigen Verbindungen obligat (Abschnitt 3.2.2.1). Sie werden weiterhin exportiert (Tab. 3.3.19). Eine Konkurrenz um *C-Skelette* kann nicht als entscheidender Grund gesehen werden (s.o.). Die frühzeitige Streckung des Hypokotyls (Abschnitt 3.2.9) kann durch den Stärkeabbau im apikalen Hypokotyl bedingt sein, aber auch auf hormonelle Signale, die durch die Verarmung ausbleiben. Das Aufrichten des Hypokotyl ist somit nicht allein auf einen Lichtreiz und seine Beteiligung am Kohlenstoffmetabolismus zurückzuführen (Balane, 1997).

4.3 K⁺ als dominantes Kation im Phloem

4.3.1 Kaliumverteilung in den Keimblättern

Die Kaliumkonzentration in den Blättern erreicht in den meisten Pflanzen Werte zwischen 100 und 200 mM (Leigh und Wyn-Jones, 1984; Marschner, 1995). Die Keimblätter des sechs Tage alten Keimlings sind mit einer hochkonzentrierten Lösung der verschiedenen Nährstoffe vergleichbar, z.B. kann die intrazelluläre Kaliumkonzentration bis auf das 1,5fache ansteigen (Abb. 3.4.2). Da die Parenchymzellen noch keine große zentrale Vakuole besitzen, kann die vermehrte Kompartimentierung des osmotisch wirksamen Kaliums nicht allein durch Transport in die Vakuole erfolgen. Das *Unschädlichmachen* erfolgt durch Bindung an Protein- und andere Einschlußkörper (vgl. Lott *et al.*, 1985), deren Konzentration bis über 1,5 M Kalium betragen kann. Das cytoplasmatische Vorkommen ist ortsabhängig, die Differenz zwischen den einzelnen Zellagen jedoch gering. In Gerste fand man ca. 130 mM Kalium im Mesophyll und 250 mM in den Epidermen (Fricke *et al.*, 1994; Karley *et al.*, 2000). Andere Studien an der selben Pflanzenart zeigten eine bevorzugte Akkumulation im Mesophyll (Dietz *et al.*, 1992; Leigh und Storey, 1993). Interessant ist der lokale Verlauf der apoplastischen Konzentration. Sie ist erhöht in den Bereichen außerhalb der Bündelscheide, erniedrigt innerhalb, aber in der Gesamtheit durchaus mit den bei manchen anderen Pflanzen gefunden Konzentrationen vergleichbar (Grignon und Sentenac, 1991; Speer und Kaiser, 1991). Auffällig ist, daß die extrazelluläre Kaliumkonzentration bereits in den Seitenwänden der unteren Epidermis deutlich über der für den apoplastischen Raum vermuteten freien Konzentration von 1 mM liegt. Möglicherweise ist Kalium im Apoplasten fest mit polaren Gruppen assoziiert (aber Bush und Mc Coll, 1987).

4.3.2 Zirkulation von Kalium und die Phloembeladung als Kontrollpunkt

Die Abhängigkeit der Kaliumflüsse zwischen Keimblattapoplast, Blattgewebe, Phloem und Xylem sind in Abb. 4.3 dargestellt. Bei der niedrigen externen Konzentration von 0,3 mM kehren ca. 50 % des exportierten Kaliums in die Keimblätter zurück, bei der mittleren und hohen

apoplastischen Konzentration steigt dieser Anteil sogar auf 60-80 % an (Abschnitt 3.3.2.4). Wird Kalium an der Wurzel angeboten, zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Kaliumkonzentration im Wurzelmedium und dem Kaliumtransport im Xylem (Abschnitt 3.3.3). Anders verhält es sich mit den Flüssen im Phloem. Trotz gesteigertem Eintrag in den Apoplasten der Keimblätter übersteigt der Massenfluß im Phloem einen distinkten Wert (ca. $0,55 \mu\text{Mol h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$) nicht. Das zusätzlich in die Keimblätter importierte Kalium akkumuliert in den Keimblättern.

Auch Jeschke *et al.* (1985; Lupinen) und Jeschke und Pate (1991c; *Ricinus communis*) gehen bei Ricinuspflanzen von ca. 80 % Zirkulation aus (auch Armstrong und Kirkby, 1979; Bhatti *et al.*, 1993; Jeschke *et al.*, 1995). Der Kaliumtransport wird jedoch nicht nur vom externen Kaliumangebot bestimmt sondern auch durch die Beladungskapazität des Phloems. Neben der Regulation der Kaliumflüsse durch die Verhältnisse im Bereich des Phloems ist eine zusätzliche Regulation durch die Aufnahme ins Xylem wahrscheinlich, da es ansonsten zu einem übermäßig hohen Kaliumeintrag in die Blätter kommen würde (Engels und Marschner, 1992). In der Wurzel wurden am Xylemparenchym Kalium-Kanäle gefunden (Maathuis *et al.*, 1997; Wegner und De Boer, 1999), genauso in den Blättern im Bereich des Phloems (Marten *et al.*, 1999).

4.3.3 Rolle der apoplastischen Konzentration für den K^+ -Transport im Phloem

Die Phloembeladung von Saccharose und einiger Aminosäuren, wie z.B. von Glutamin (Baker *et al.*, 1980; Lohaus *et al.*, 1995), erfolgt bevorzugt auf apoplastischem Wege. Um dies zu ermöglichen, müssen die im Mesophyll gebildete Assimilate zunächst in den Apoplasten entlassen werden. Die Abgabe erfolgt vermutlich als Co-Transport zusammen mit Kalium (Huber und Moreland, 1981). Schobert *et al.* (1998) konnten zeigen, daß Kalium-Ionen den Efflux der Saccharose aus den Mesophyllzellen des Ricinuskeimblattes stimulieren. Die apoplastische Konzentration ist dort tatsächlich erhöht (Abb. 3.4.1). Andererseits wird Kalium aufgrund der ATPase-Aktivität im Plasmalemma der Siebzellen vermehrt in den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex aufgenommen. Die Aufnahme der Saccharose aus dem Apoplasten ist ein aktiver Transport und hängt vom Membranpotential ab (Komor, 1977; Riesmeier *et al.*, 1994). Kationen, die von Mesophyllzellen im Ricinuskeimblatt aufgenommen werden, depolarisieren das Plasmalemma dieser Zellen (Köhler, 1992). Wenn diese Depolarisierung auch die Siebröhren betrifft, können Kationen die Beladung von Saccharose in die Siebröhren direkt beeinträchtigen. Ein Zusammenhang zwischen dieser Depolarisation und den Kaliumflüssen wurde bislang jedoch nicht eindeutig nachgewiesen (Reinhold und Kaplan, 1984; Marten *et al.*, 1999).

Die Phloembeladung selbst hängt außerdem von der osmotischen Wirksamkeit der Teilchen des Phloeminhaltes und dem Turgor der Siebzellen ab. Ein hoher Turgor hemmt die Beladung. Die von der ATPase aufgebaute elektrische Potentialdifferenz bewirkt die Aufnahme von Kationen (K^+), das Wasserpotential der Zelle wird erniedrigt, es kommt zum Wassereinstrom und der Turgor baut sich ab. Kommt es zu einer übermäßigen Anreicherung im Apoplasten der Leitbündel, hat dies negative Auswirkungen auf den Turgor, der für den Massenfluß im Phloem verantwortlich ist. Der Volumenfluß (Abschnitt 3.3.2.1 und 3.3.2.4) und damit auch der Saccharoseexport werden reduziert. Ein weiterer Regulator für die Verhältnisse im Blattapoplasten

ist die Aufnahme- und Abgabetätigkeit der Xylemparenchymzellen (möglicherweise als Transferzellen ausgebildet). Die Kaliumkonzentration ist dort tatsächlich erhöht (Abb. 3.4.1). Die optimale Kaliumkonzentration im apoplastischen Raum zwischen der Unterseite der Keimblätter und dem Endosperm scheint 1,5 mM zusammen mit ca. 100 mM Saccharose (siehe Abschnitt 2.3.1) zu betragen. Dies ist die einzige Bedingung, bei der die *in vivo*-Situation mit einer Volumenflußrate von $17 \mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$ erreicht wird (Abschnitt 3.1.3).

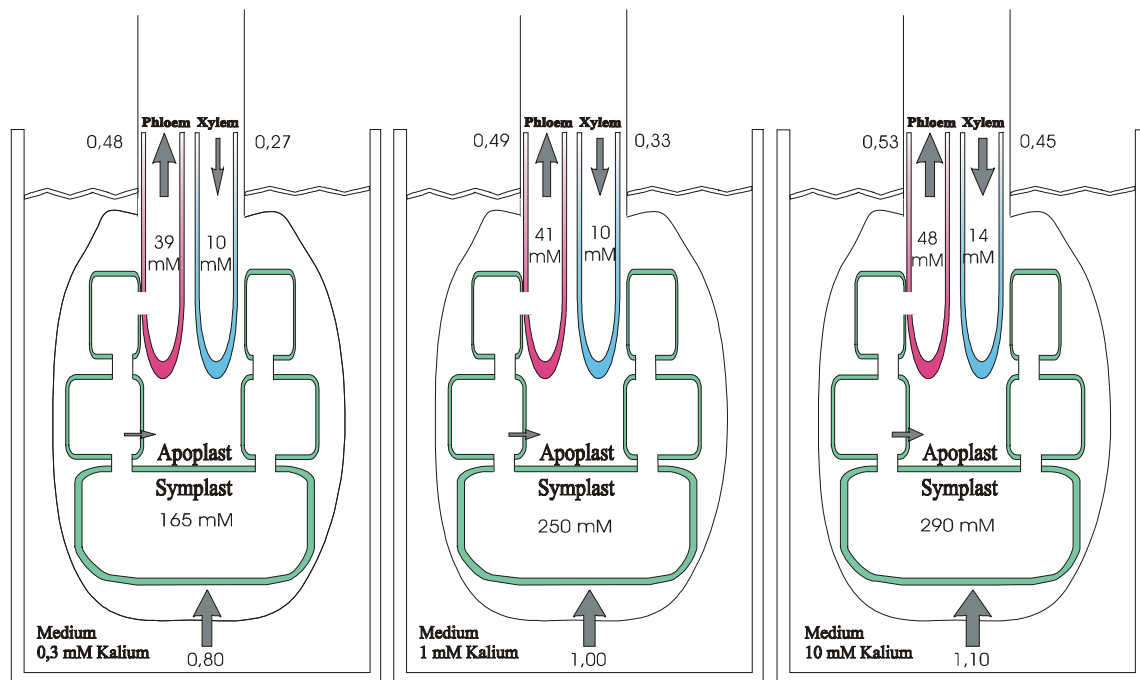


Abb. 4.3 *Steady state*-Flüsse des Kaliums in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen in Abhängigkeit von der externen, apoplastischen Konzentration. Es sind die Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] zwischen dem Blattapoplasten, dem Blattgewebe, dem Phloem und dem Xylem angegeben. Sie sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *steady state*-Konzentrationen [mM] sind angegeben.

4.3.4 Speicherkapazität des Blattapoplasten

Der Apoplast der Keimblätter stellt einen wichtigen Transportweg für Kalium zwischen dem Mesophyll und den Leitbahnen dar. Er ist auch ein Speicher, der durch die Substanzaufnahme und -abgabe aus den einzelnen Zellen beeinflusst wird. Die apoplastische Konzentration wird durch den Xylemimport, den Phloemexport aber auch durch die Aufnahme aus dem apoplastischen Raum beeinflusst. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die apoplastische Konzentration einer strengen Regulation unterliegen muß (siehe auch Freundling *et al.*, 1988). Aus den Phloem- und Xylemflüssen (nach Equilibrierung über den Blattapoplasten) läßt sich errechnen, wie lange die Speicherkapazität des Apoplasten (12,6 % des Keimblattvolumens; Köhler, 1992) für die gemessene Beladungsrate reichen würde, mit Rezirkulation über das Xylem. Diese Werte drücken aus, wie bei einer bestimmten Konzentration bestimmte Nährstoffe Gefahr laufen, Fluktuationen im Apoplasten bzw. als Konsequenz auch bei der Phloembeladung zu unterliegen, z.B. wenn die Nachlieferung aus dem Symplasten und aus dem apoplastischen Raum ausbleibt. Im

Fälle der untersuchten externen Konzentrationen an Kalium, ergeben sich Werte zwischen ungefähr 1,5 (0,3 mM), 7 (1 mM) und 81 Minuten (10 mM). Der Apoplast ist somit bei der vermeintlichen geringen *in vivo*-Konzentration von 1 mM Kalium auf stete Nachlieferung aus dem Endosperm angewiesen. Dies stellt einen effektiven Weg dar, zu hohe apoplastische Konzentrationen, die sich besonders negativ auf den Massenfluß im Phloem auswirken, zu vermeiden.

4.4 Phosphat als Hauptkomponente des Phosphorferntransports

4.4.1 Phosphorverteilung in den Keimblättern

In den Keimblättern des Ricinuskeimlings werden große Mengen von Phosphor in Form von Einschlüßkörpern, die zusätzlich auch magnesium- und kaliumhaltig sind, gespeichert. Es handelt sich dabei vermutlich um Phytat (*myo*-Inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat; Abschnitt 3.4.1). Diese Einschlüsse kommen v.a. im Schwamm- und Palisadenparenchym vor. Desweiteren ist dort auch die intrazelluläre P-Konzentration erhöht (Leigh und Storey, 1993; Williams *et al.*, 1993). Anzumerken ist jedoch, daß dies keine Rückschlüsse auf die Aufnahmeaktivität und die Verteilung der Transporter in den Membranen zuläßt. Für Calcium wurde z.B. gezeigt, daß es v.a. in den Epidermen lokalisiert ist, aber der Influx dort eine mit den aus dem Mesophyll isolierten Protoplasten vergleichbare Rate erreicht (Karley *et al.*, 2000). In dieser Studie wurde aber auch nachgewiesen, daß P_i v.a. im Mesophyll akkumuliert wird (vgl. auch Williams *et al.*, 1993; Fricke *et al.*, 1994). Die apoplastische Phosphorkonzentration ist an allen Stellen unerwartet hoch. Diese Verhältnisse können nicht allein durch das Vorkommen von freiem Phosphat erklärt werden, es müssen auch noch einen Vielzahl anderer P-haltiger Verbindungen dazu beitragen. Diese scheinen durch Bindung an die Zellwände immobilisiert. Zur Beantwortung dieser Frage sollten zunächst ^{31}P -NMR-Messungen an den Keimblättern durchgeführt werden.

4.4.2 Phosphataufnahme in die Keimblätter

Das Verhältnis von Phosphat zu Gesamtphosphor beträgt in den Keimblättern von Keimlingen mit Endosperm 0,6. Gleiches findet man im Siebröhrenexsudat (Geigenberger *et al.*, 1993) wieder. Nach Transfer in phosphathaltiges Medium ist anteilig mehr Phosphat in den Keimblättern vorhanden, zusätzlich wird nun mengenmäßig mehr Phosphor exportiert (Abb. 3.4.4). Bei niedriger und mittlerer apoplastischen Konzentration kommt es sogar zu einem Nettoverlust von Phosphor aus den Keimblättern (Abb. 3.4.3). Das bedeutet, daß die Phosphoraufnahme unter *in vivo*-Bedingungen nicht ausschließlich in Form von Phosphat getragen wird und daß das aus dem apoplastischen Raum aufgenommene Phosphat sehr effektiv in den Ferntransport fließt. Insgesamt gesehen ist die Phosphat-Aufnahme immer um einen distinkten Anteil höher als der Phosphat-Export.

Überall dort, wo der Apoplast als Kompartiment am Transport beteiligt ist, kann durch die Aufnahmeaktivität der Zellen die Verteilung der Stoffe in den Geweben reguliert werden. Der Transport wird durch integrale Membranproteine katalysiert. Man unterscheidet zwei Systeme für den Phosphattransport über Membranen: 1.) ein hochaffines System, das bei geringen Konzentrationen (μM) aktiv ist und 2.) ein niederaffines System für hohe Konzentration (mM) (Leggewie *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Die Gene für den hochaffinen Transporter wurden bereits bei Hefe (Bun-Ya *et al.*, 1991; Versa, 1995) und Höheren Pflanzen wie *Arabidopsis*, Kartoffel, Tomate, *Catharanthus*, *Medicago* und Gerste kloniert (Raghothama, 2000). Auch der niederaffine Transporter aus *Arabidopsis* wurde vor kurzem gefunden (Daram *et al.*, 1999). In Anbetracht der hohen intrazellulären Phosphatkonzentration kann man davon ausgehen, daß die Carrier im Mesophyll hochaffin sind, aber mit niedriger Rate arbeiten.

4.4.3 Abschätzung der apoplastischen Phosphatkonzentration

Schobert *et al.* (1998) konnten zeigen, daß externe Phosphat-Ionen die Saccharoseaufnahme der Mesophyllzellen, aber auch die Saccharosebeladung des Phloems hemmen. Die Pflanze scheint dieses Problem dadurch zu lösen, daß sie Phosphat in den Symplasten aufnimmt und P hauptsächlich (mindestens 60 % bis 70 %) in organischer Form exportiert (Abschnitt 3.4.2.1). So können zu hohe Salzzakkumulationen im Apoplasten und eine zu hohe intrazelluläre Phosphatkonzentration (Phosphattoxizität; Schachtmann *et al.*, 1998) vermieden werden. Ein weiterer Hinweis auf eine *geringe* freie apoplastische Phosphatkonzentration ist die Speicherkapazität der Blattapoplasten. Aus den für Phosphat gemessenen Phloem- und Xylemflüssen (Abschnitt 3.4.2.3) läßt sich errechnen, wie lange die Speicherkapazität im Blattapoplasten für die gemessene Beladungsrate reichen würde, mit und ohne Rezirkulation über das Xylem. Bei der niedrigen apoplastischen Konzentration steigt die Speicherdauer von 3 auf 10 min, bei der mittleren apoplastischen Konzentration von 8 auf 18 min und bei 10 mM Phosphat im Medium von 21 auf 35 min. Insgesamt gesehen erfolgt keine übermäßige Phosphatspeicherung im Apoplasten. Dies wäre auch aufgrund der oben genannten Gründe nicht sehr vorteilhaft für die Pflanze.

Nach Equilibrierung in 10 mM Phosphat über den Keimblattapoplasten stieg die Phosphatkonzentration im Siebröhrenexsudat bis auf 32 mM an, während Zhong (1994) nur ca. 5 mM nachweisen konnte. Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums unterschied sich durch die Ab- bzw. Anwesenheit von Saccharose. Es existiert jedoch kein offensichtlicher Grund für eine Abhängigkeit der Phosphatkonzentration im Exsudat und dem Saccharoseangebot im Apoplasten. Die Anwesenheit von Phosphat im Keimblattapoplasten, bewirkt die Freisetzung von Phosphat aus den Phytat-Körpern (Zhong, 1994; Abb. 3.4.1). Ein vermehrtes Vorkommen dieser Einschußkörper erklärt auch den unerwartet hohen Phosphattransport der in Puffer inkubierten Keimlinge (Abschnitt 3.1.1). Im Einklang mit Ergebnissen von Zhong (1994) erhöht Phosphat die Phloemleitfähigkeit (Volumenfluß). Die Exsudationsrate ist einerseits vom radialen Wasserfluß andererseits von der axialen Leitfähigkeit abhängig. Die einfachste Erklärung (nach Zhong, 1994) für die Erhöhung der Volumenflüsse durch Phosphat ist eine Wirkung auf die axiale Leitfähigkeit.

Phosphat könnte die Konzentration der freien Calcium-Ionen erniedrigen und somit negativ auf die Calloseablagerung um die Siebporen einwirken.

4.4.4 Auswirkungen der apoplastischen Phosphatkonzentration auf den Ferntransport in Phloem und Xylem

Biddulph *et al.* (1958) konnten durch die Gabe von radioaktivem Phosphor zeigen, daß das Element Phosphor einer starken Metabolisierung unterliegt und mehrfach pro Tag in seiner Versuchspflanze zirkuliert. Jeschke *et al.* (1997) wiesen dies für adulte *Ricinus*-Pflanzen nach. Auch bei Ricinuskeimlingen zirkuliert Phosphat über Phloem und Xylem (Abschnitt 3.5.2.3). Die im Xylem transportierte Phosphatkonzentration ist jedoch unter diesen Bedingungen gering (Abb. 4.4). Eine Zirkulation im großen Umfang ist nicht notwendig, da die Phosphatassimilation in allen Teilen der Pflanze erfolgen kann. P_i ist aber an der Regeneration und Aktivität der ATPase, d.h. an der aktiven Saccharosebeladung, beteiligt. Aus diesem Grund fordern Marschner *et al.* (1997) eine *Rückkehr* der Phosphats zur Phloembeladungsstelle.

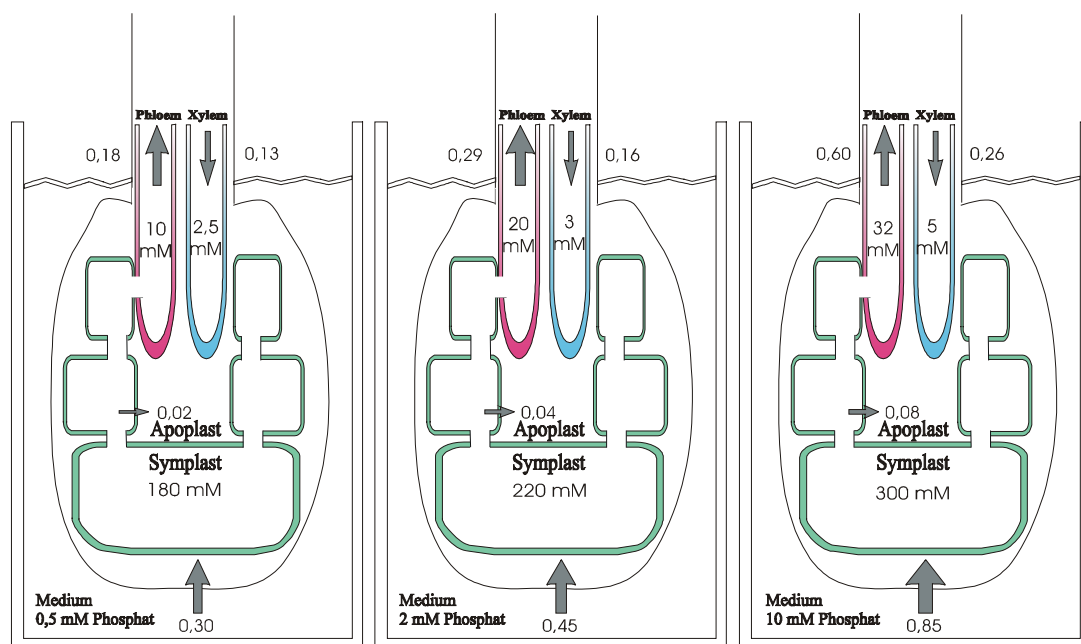


Abb. 4.4 *Steady state*-Flüsse des Phosphats in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen in Abhängigkeit von der externen, apoplastischen Konzentration. Es sind die Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] zwischen dem Blattapoplasten, dem Blattgewebe, dem Phloem und dem Xylem angegeben. Sie sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *steady state*-Konzentrationen [mM] sind angegeben.

4.4.5 Phosphattransport nach Angebot über die Wurzel

Bietet man Phosphat über die Wurzel an, steigt der Phosphatmassenfluß im Xylem mit der externen Konzentration an. Er ist im Vergleich zum Angebot über die Keimblätter deutlich

erhöht. Im Gegensatz dazu ist der Phloemrücktransport reduziert (Abschnitt 3.4.4). Das übermäßig in die Keimblätter importierte Phosphat akkumuliert dort nicht sondern wird anscheinend in Form von organischen P-Verbindungen erneut exportiert. Phosphor rezirkuliert. Bietet man Phosphat gleichzeitig über die Keimblätter und über die Wurzel, sind die Flüsse in beiden Leitbahnen im Vergleich zur *Einzelinkubation* erniedrigt (Abschnitt 3.4.5). Phosphat bleibt vermehrt in den Keimblättern zurück. Eine zusätzliche Phosphorakkumulation konnte jedoch nicht gefunden werden. Es scheint bei guter Versorgung der Keimblätter und einem steten Eintrag in den Keimblattapoplasten zu einer *feedback*-Regulation auf die Aufnahme über die Keimblätter, den Phloemexport und die Freisetzung aus Einschlußkörpern (s.o.) zu kommen. Eine andere Erklärung kann sein, daß die Phosphatanreicherung im Apoplasten rund um das Phloem auf die Saccharosebeladung und somit auf den Massenfluß zurückwirkt (s.o.). Der Volumenfluß im Phloem ist tatsächlich reduziert.

Sowohl die Phosphataufnahme durch die Wurzel als auch die Abgabe ans Xylem stellen weitere mögliche Kontrollpunkte für den Phosphorhaushalt dar. Es handelt sich dabei um zwei unabhängig voneinander arbeitende Vorgänge. Bei Phosphatmangel und sicherlich auch bei Überangebot werden jedoch beide Prozesse beeinflusst. Eine Mutation, die die Xylembeladung betrifft, kann durch ein erhöhtes Phosphatangebot an der Wurzel überwunden werden (Poirier *et al.*, 1991). Es kommt zu einem passiven *leakage* von Phosphat ins Xylem. Ein hoher Phosphateintrag in den Wurzelapoplasten scheint die Xylembeladung aber zu reduzieren (Abschnitt 3.4.5), d.h. er muß auf die Aufnahme zurückkoppeln. So können wiederum hohe Konzentrationen im Apoplasten der Blätter, als Zielorgane des Transpirationsstroms, vermieden werden.

4.4.6 Phosphat-Homöostase in den Keimblättern

Die Nährstoffkonzentration in den einzelnen Kompartimenten der verschiedenen Pflanzenorgane, wie z.B. die des Blattes, ist keine zufällige Größe sondern unterliegt einer strengen Regulation. Schon früh erkannte man, daß unter Phosphatmangel P_i aus den älteren Blättern mobilisiert und zu den jüngeren Blättern transportiert wird (Biddulph *et al.*, 1958). Mittlerweile konzentriert man sich immer mehr auf die Vorgänge innerhalb eines Organs und auf die subzellulären Kompartimente (Mimura, 1995; Mimura *et al.*, 1996). Messungen der Phosphatkonzentration in isolierten Protoplasten und Vakuolen zeigten, daß die cytoplasmatische Konzentration konstant und unabhängig vom Substratangebot ist. Der Pool in der Vakuole nimmt unter moderaten Mangelzuständen zugunsten der cytoplasmatischen Konzentration ab (Lee und Ratcliff, 1993; Mimura *et al.*, 1996). Wurden verschiedene Phosphatkonzentrationen über den Transpirationsstrom *gefüttert*, blieb die apoplastische Konzentration der untersuchten Gerstenblätter unverändert. Folgte auf einen Phosphatpuls (10 mM) ein *chase* (Wasser), oszillierte die apoplastische Konzentration um ein konstantes Niveau. Diese Ergebnisse lassen auf eine apoplastische Phosphat-Homöostase schließen (Mimura *et al.*, 1990, 1992). Die apoplastische Konzentration scheint über die Aufnahmeaktivität der Zellen reguliert.

Es gibt aber auch eine symplastische Phosphat-Homöostase, die wiederum durch Transport über den Tonoplasten gesteuert wird. Die Speicherung in der Vakuole wirkt bis auf die

apoplastische Konzentration zurück. Bei längeranhaltendem Phosphatmangel wird die cytoplasmatische Konzentration konstant gehalten, die Vakuole verarmt und die apoplastische Konzentration nimmt parallel zur Gesamtkonzentration ab. Somit erkennt man erst bei Betrachtung von Langzeitprozessen, daß der cytoplasmatische Phosphatlevel hochreguliert und wichtiger ist als der Level des extrazellulären Raums. Dies trifft bei Gerste (Mimura *et al.*, 1996) erst auf ein Blattalter von mehr als 8 Tagen zu. Interessanterweise liegt die apoplastische Phosphatkonzentration in dieser Untersuchung zwischen 0,1 und 1 mM. Sie ist mit der für den Keimling vermuteten Konzentration von 2 mM vergleichbar. Unter den oben genannten Gesichtspunkten sind auch die an den älteren Keimblättern bzw. bei Nährstoffentzug beobachteten Verhältnisse nicht erstaunlich. Die Pflanzen sind bemüht, auch unter Phosphormangel die cytoplasmatische Phosphatkonzentration konstant zu halten, während der apoplastischer Speicher *leerläuft* (Abschnitt 3.4.8).

4.5 Sulfat als Hauptkomponente des Schwefelferntransports

4.5.1 Schwefelverteilung in den Keimblättern und Sulfataufnahme aus dem apoplastischen Raum

Schwefel ist vergleichsweise gleichmäßig in den Zellen der Keimblättern verteilt, der relative apoplastische Gehalt (gewonnen durch Vergleich mit Standards definierter Konzentration) unerwartet hoch (Abb. 3.5.1). Dies läßt, wie schon für Kalium und Phosphor vermutet, nur den Schluß zu, daß Schwefel fest an eine Vielzahl von extrazellulären Strukturen gebunden ist. Die Sulfataufnahme aus dem apoplastischen Raum in die Keimblätter ist frühzeitig gesättigt (Abschnitt 3.5.2.4), einen Nettoverlust von Schwefel aus den Keimblättern findet man nur bei erniedrigter externer Konzentration (Abb. 3.5.2). D.h. die Aufnahme ist effektiv auf den *Bedarf* des wachsenden Keimlings *abgestimmt*, toxische Wirkungen eines übermäßigen Sulfatangebotes können somit vermieden werden. Dies steht im Einklang mit anderen Studien (Renosto *et al.*, 1993). Das Verhältnis Schwefel zu Sulfat schiebt sich aber mit ansteigender externer Sulfatkonzentration in Richtung Sulfat, folglich besitzen die Keimblätter nicht die Fähigkeit größere Mengen an Sulfat zu assimilieren.

Anders verhält es sich mit dem Phloemtransport. Hier ist zu erkennen, daß der Export zwischen der mittleren und hohen apoplastischen Konzentration noch merklich ansteigt (Abb. 4.5). Die Phloembeladung erfolgt nach Zhong *et al.* (1998) auf apoplastischem Wege. Der/die Carrier am Mesophyll arbeiten mit einer zu denen am Phloem unterschiedlichen Rate. Der Efflux entspricht etwa einem Sechstel der Aufnahme. Er ist somit im Vergleich zu den anderen Elementen hoch und vermutlich ein aktiver Prozeß. Die dafür verantwortlichen Transporter wurden bislang noch nicht in Pflanzen identifiziert, ihr Vorkommen ist jedoch wenig umstritten (Smith *et al.*, 2000). Wie erwähnt, scheinen für die Aufnahme in die Zellen der Keimblätter und die Phloembeladung aus dem Apoplasten verschiedene Mechanismen und Transporter verantwortlich zu sein. Physiologische Studien an anderen Pflanzenarten haben ergeben, daß für den

Sulfattransport (Kurz- und Langstreckentransport) unterschiedliche Systeme mit verschiedenen Affinitäten zur Verfügung stehen (Lass und Ullrich-Eberius, 1984; Kreuzwieser *et al.*, 1996). Ihr Auftreten ist zellspezifisch (Clarkson *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 2000).

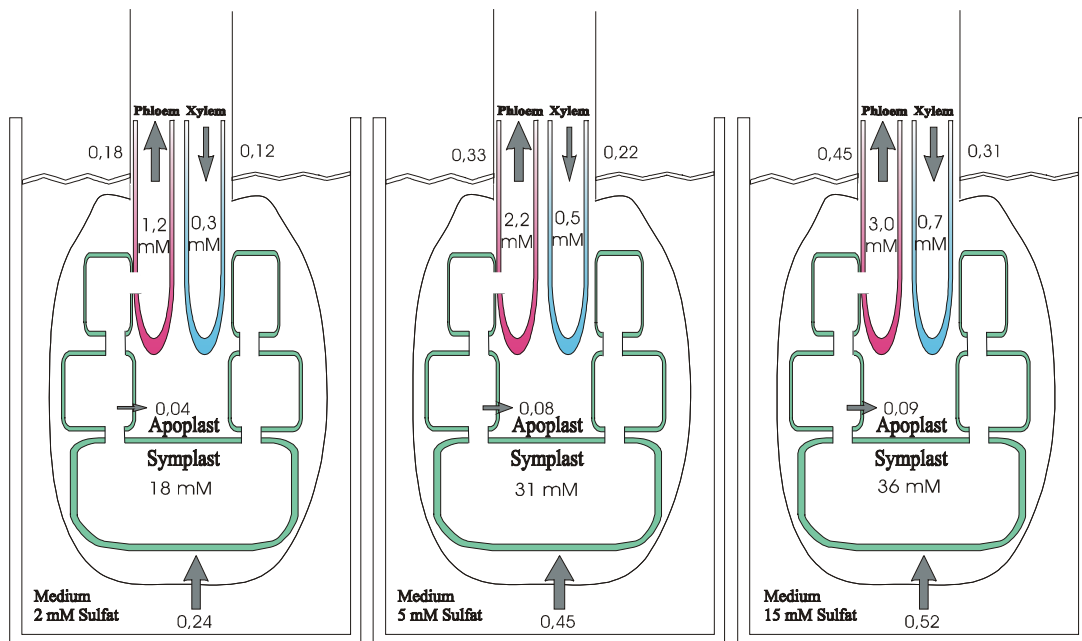


Abb. 4.5 *Steady state*-Flüsse des Sulfats in den Keimblättern von sechs Tage alten Ricinuskeimlingen in Abhängigkeit von der externen, apoplastischen Konzentration. Es sind die Flüsse [$\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$] zwischen dem Blattapoplasten, dem Blattgewebe, dem Phloem und dem Xylem angegeben. Sie sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *steady state*-Konzentrationen [mM] sind angegeben.

4.5.2 Sulfatfernttransport – Zirkulation zwischen Phloem und Xylem

Bonas *et al.* (1982) konnten zeigen, daß grüne Zellen (sicherlich auch schon Keimlinge) die Fähigkeit besitzen, mehr Sulfat zu reduzieren, als sie für ihren eigenen Verbrauch nutzen. Sie gehen davon aus, daß das Überangebot in reduziertes Glutathion eingebaut wird. Tatsächlich führt eine Erhöhung des Sulfatangebotes im Apoplasten zu einem Anstieg des Exportes von organischen Schwefelverbindungen (Tab. 3.5.1). Aus der Bilanzierung in Abb. 4.5 ist ersichtlich, daß auch der Abtransport von anorganischem Sulfat aus den Keimblättern ansteigt. Zusätzlich ist der Xylemtransport von Sulfat durch die externe, apoplastische Sulfatkonzentration beeinflussbar. Der Import in die *sink*-Organe betrug in allen Fällen ungefähr 70 % des Exportes, d.h. nur etwa 30 % wurden dort verbraucht oder gespeichert.

Bei adulten Pflanzen wird eine Schwefelzirkulation gefordert, da die Sulfataufnahme über die Wurzel die Assimilation jedoch hauptsächlich in den Blättern erfolgt. Sulfat wird aktiv ins Xylem beladen und bis in die Blätter transportiert (Takahashi *et al.*, 2000). Dort kann es aus dem Apoplasten in die Zellen aufgenommen, über die Membranen der Chloroplasten transportiert und assimiliert werden. Die Versorgung der anderen Teile der Pflanze erfolgt in Form von organischen

Schwefelverbindungen, v.a. reduziertes Glutathion aber auch Methionin und Cystein (Herschbach und Rennenberg, 1994), die zurück in die Wurzel transportiert werden. Somit ist der Kreis geschlossen. In Weizen zirkulieren zwischen 12-33 % des Schwefels (Larson *et al.*, 1991). Auch Schupp *et al.* (1991) und Sunarpi und Anderson (1996) gehen von einer regen Schwefelzirkulation aus. Im Keimling beginnt und endet dieser Kreis in den Keimblättern und speziell im Apoplasten. Es zirkulieren große Mengen an anorganischem Schwefel, weniger organische Schwefelverbindungen (Abschnitt 3.5.2.1, Tab. 3.5.1). Der Keimling scheint nicht die Möglichkeit zu besitzen, diese große Mengen an Sulfat *gleichzeitig* umzusetzen. Der Export aus den Blättern löst aber nur lokal das Problem des Überangebotes für die Pflanze (Sulfattoxizität in den Zellen; Salzakkumulation im Apoplasten). Eine Abgabe in die Umwelt stellt eine wesentlich bessere Möglichkeit der *Schwefelentgiftung* dar, wobei eine Abgabe an die Atmosphäre einer Abgabe an die Rhizosphäre vorzuziehen ist (Rennenberg, 1984). Tatsächlich konnte auch in den inkubierten Keimlingen kein Efflux über die Wurzel nachgewiesen werden (Abschnitt 3.5.6).

4.5.3 Sulfattransport nach Angebot über die Wurzel

Bietet man Sulfat über die Wurzel an, kommt es im Vergleich zur Situation ohne zusätzliches Sulfat zu einer Erhöhung des Sulfattransport im Xylem (Abschnitt 3.5.3). Der Rücktransport über das Phloem ist jedoch gering. Interessanterweise akkumulieren die Keimblätter Sulfat verlieren aber netto an Schwefel, ihre Fähigkeit zur Sulfatreduktion scheint, wie bereits erwähnt, nicht stark ausgeprägt (Abschnitt 4.5.4). Um die Frage nach dem Ort der Sulfatassimilation zu beantworten, sollte der Transport von organischen S-Verbindungen im Xylem verfolgt und die Aktivität einiger für die Sulfatassimilation zuständiger Enzyme ortsspezifisch quantifiziert werden.

Phylogenetische Studien, basierend auf Sequenzanalysen, gehen sogar von vier Gruppen von Transportern mit unterschiedlicher Funktionalität und Gewebespezifität aus (Übersicht in Takahashi *et al.*, 2000). In der Wurzel wird z.B. Sultr1;1 ausschließlich in der Wurzelspitze und den äußeren Schichten expremiert, d.h. in den Zellen, die Kontakt mit Bodensulfat haben. Die Expression der hochaffinen Transporter der Gruppe 1 kann entweder durch Sulfat oder durch einige organische Schwefelverbindungen reguliert werden (*feedback*-Regulation). Sultr2;1 und Sultr2;2, als Vertreter der Gruppe 2, sind für den Ferntransport aus der Wurzel in die Blätter zuständig. Sie sind beide für die Xylembeladung verantwortlich und in den Wänden der Xylemparenchymzellen lokalisiert. Die Transporter der Gruppe 3 findet man ausschließlich in Blättern und die der Gruppe 4 werden in Chloroplasten expremiert. Sulfat kann aber auch v.a. beim Transport in die Chloroplasten Phosphat-Transporter nutzen (Rennenberg, 1984).

4.5.4 Keimblätter oder Wurzel als Ort der Sulfatreduktion

Obwohl Schwefel auch in geringen Mengen direkt als Sulfat in den Stoffwechsel einfließen kann, ist die Reduktion zum Aufbau von schwefelhaltigen Verbindungen notwendig. Es handelt sich dabei v.a. um die Aminosäuren bzw. Peptide Glutathion, Methionin und Cystein. Schobert und Komor (1989) gehen davon aus, daß man im apoplastischen Raum zwischen

Keimblättern und Endosperm kein Cystein und auch kein Methionin findet (Tab. 2 Anhang; Glutathion wurde nicht untersucht). Im Phloem des sechs Tage alten Keimlings wird Schwefel zu 50 % und mehr in organischer Form transportiert (Komor *et al.*, 1996; Tab. 3.5.1), ein Umbau in den Keimblättern ist wahrscheinlich. Es konnte gezeigt werden, daß die Sulfatreduktion ein lichtabhängiger Prozeß ist. Die Reduktion und der Einbau in Kohlenstoffskelette findet in den Chloroplasten statt (Milfin und Lea, 1977), sie kann aber auch ohne Belichtung in der Wurzel erfolgen (Brunold und Suter, 1989). Da die Keimlinge noch nicht photosynthetisch aktiv sind, besitzen sie auch keine voll entwickelten Chloroplasten, folglich ist von einer Sulfatassimilation in der Wurzel auszugehen. Schon früh fand man, daß auch Wurzeln und im Dunkeln gewachsene Zellkulturen fähig sind, Sulfat zu reduzieren (Pate, 1965; Smith, 1975). Dafür spricht auch der geringe Sulfatmassenfluß im Xylem nach Angebot über die Wurzel (Abschnitt 3.5.3). Um die oben erwähnten Verhältnisse des Phloemtransports zu erreichen, ist eine zusätzliche Versorgung mit organischen Schwefelverbindungen entweder durch die Synthesetätigkeit in den Keimblättern, z.B. in den Proplastiden, oder über das Endosperm wahrscheinlich. Durch EDX-Messungen (Abb. 3.5.1) konnte kein S in den Plastiden gefunden werden, das Ausmaß der Sulfatassimilation in den Keimblättern ist vernachlässigbar. Dies läßt im Gegensatz zu Schobert und Komor (1989) auf eine Versorgung über das Endosperm schließen (s.o.).

4.6 Stoffliche Zusammensetzung des Blattapoplasten – Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es eine Vielzahl von Größen innerhalb der Pflanze durch die stoffliche Zusammensetzung der Apoplastenlösung beeinflusst sind, der Schwerpunkt der Betrachtung lag dabei die Wechselwirkung der apoplastischen Substratkonzentration mit dem Ferntransport über Phloem und Xylem. Abb. 4.6 zeigt weitere Flüsse durch den Keimblattapoplasten. Die stoffliche Zusammensetzung des Blattapoplasten ist folglich nicht nur von der Stoffkonzentration im apoplastischen Raum zwischen Endosperm und Keimblättern bzw. der künstlichen Apoplastenlösung (Medium) abhängig sondern u.a. auch von:

- der Diffusionsgeschwindigkeit der Stoffe in die und in den Keimblättern,
- der Aufnahmeaktivität der Parenchymzellen (2)
- Anteil der Diffusion in den Apoplasten (1)
- Metabolisierungs-, Mobilisierungsaktivität (3) der Parenchymzellen,
- der Carrierausstattung der Zellen,
- der Stoffkonzentration in den verschiedenen Zelltypen der Keimblätter,
- der Stoffabgabe aus den Parenchymzellen (4),
- der Exportrate über das Phloem (5),
- dem Eintrag über das Xylem (6),
- Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Stoffen und Prozessen.

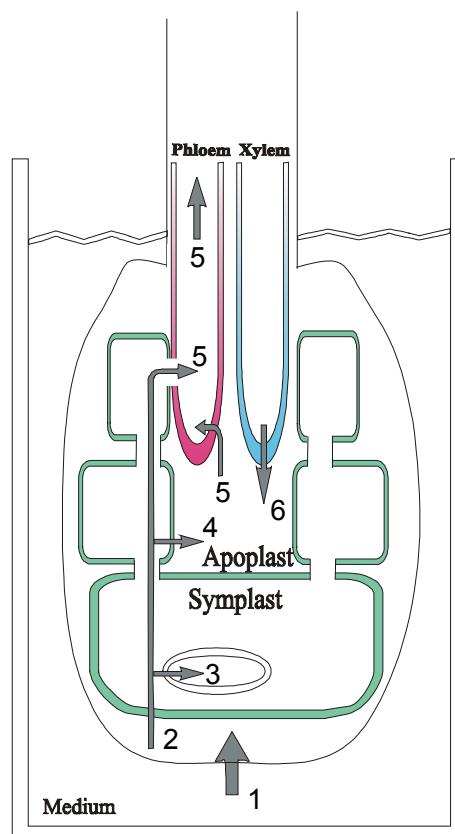


Abb. 4.6 Flüsse durch die Keimblätter des Ricinuskeimlings ausgehend vom apoplastischen Raum zwischen den Keimblättern und dem Endosperm, das durch ein Medium (künstliche Apoplastenlösung) ersetzt wurde.

4.7 Anhang

Tab. 1 Durch Wuchsanalyse ermittelte Phloemflußraten für verschiedene Elemente, bestimmt aufgrund des tatsächlichen Zuwachses der *sink*-Gewebe (nach Zhong, 1994).

Element	Einbau in <i>sink</i> -Gewebe $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$	Transportform	Konzentration im Exsudat [mM]	erforderliche Phloemflußrate $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$
C	67	Saccharose Aminosäuren	300 150	15
N	4	Aminosäuren	150	21
S	0,15	SO_4^{2-} organisches S	2,5 2,1	33
P	0,22	PO_4^{3-} organisches P	3,5 5,9	23
Mg	0,16	Mg^{2+}	5,5	29
K	0,34	K^+	20	17

Tab. 2 Aminosäurenkonzentration in den am Transport beteiligten Geweben des sieben Tage alten Ricinuskeimlings (mM bezogen auf den Wassergehalt) (nach Schobert, 1988).

Aminosäuren	Endosperm	Apoplast zwischen Endosperm und Kotyledon	Kotyledon	Phloemexsudat	Hypokotyl
neutral	15,6	14,1	29,4	119,3	83,2
gln	1,3	2,7	16,5	49,9	46,9
val	2,0	1,6	6,7	16,1	9,0
ile	1,4	1,3	3,7	10,6	6,3
ser	1,9	0,8	4,5	8,8	3,4
thr	1,3	1,3	3,6	8,2	2,5
leu	1,6	0,7	2,2	6,1	1,4
GABA	0,2	2,2	4,6	5,8	5,6
phe	1,2	0,7	2,5	5,5	1,6
asp	0,4	0,3	2,0	4,9	2,4
ala	2,8	2,1	1,9	1,1	2,7
gly	1,0	0,4	0,8	0,7	0,7
tyr	0,2	0,0	0,4	0,7	0,2
cys	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0
met	0,2	0,0	0,0	0,4	0,5
sauer	3,6	1,0	14,1	5,9	19,6
glu	2,9	0,5	11,5	5,0	16,3
asp	0,7	0,5	2,6	0,9	3,3
basisch	4,2	3,4	27,6	32,4	20,6
lys	0,5	1,7	2,6	13,6	2,4
arg	2,5	1,0	20,0	11,1	14,7
his	1,0	0,5	3,6	5,7	3,0

5 Zusammenfassung

Die stoffliche Zusammensetzung der Apoplastenlösung ist keine unabhängige Größe, sondern Ausgangspunkt und Ergebnis mehrerer in gegensätzliche Richtungen verlaufende Flüsse. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Nährstoffflüsse zwischen Blattapoplast, Blattgewebe, Phloem und Xylem nach Equilibrierung mit einer definierten apoplastischen Substratkonzentration zu messen und zu bilanzieren. Von Interesse waren die Elemente und Ionen Kohlenstoff (Saccharose), Stickstoff (Glutamin), Kalium, Phosphat und Sulfat. Als Versuchsobjekt diente der sechs Tage alte Keimling von *Ricinus communis* L..

Externe Saccharose wird in die Keimblätter aufgenommen und auf apoplastischem Wege ins Phloem beladen, wobei beide Prozesse bereits unter *in vivo*-Bedingungen maximal sind. Unabhängig vom apoplastischen Angebot werden 70 % der aufgenommenen Saccharose in die *sink*-Organe exportiert, 30 % bleiben in den Keimblättern (und dem apikalen Hypokotyl) zurück. Es kommt zu keiner Zirkulation von Saccharose über Phloem und Xylem. Die in den *sink* importierte Saccharose wird annähernd quantitativ verbraucht oder gespeichert. Auch der Xylemtransport der Hexosen Glukose und Fruktose erfolgt relativ unabhängig vom apoplastischen Angebot und spielt zu keiner Zeit eine entscheidende Rolle für die Ernährung der Pflanze. Externes Glutamin wird aktiv sowohl in den Keimblättern als auch im Phloem aufgenommen, jedoch mit unterschiedlichen Raten. Der Akkumulationsfaktor zwischen Exsudat und Medium zeigt, daß v.a. bei niedriger apoplastischer Konzentration der Fluß bevorzugt in den Ferntransport läuft. Es scheint, daß der/die Glutamincarrier am Phloem wesentlich aktiver sind als der/die Carrier am Mesophyll. Nur unter moderaten Mangelbedingungen fließt Glutamin in den Stoffwechsel der *sink*-Organe ein, ansonsten kommt es zu einer 1:1-Zirkulation über Phloem und Xylem. Nitrat wird bereits in der Wurzel größtenteils reduziert und nach Import in die Keimblätter erneut, vermutlich nach Aufnahme in spezielle Transfer-Zellen, über das Phloem exportiert.

Kalium-Ionen haben einen entscheidenden Einfluß auf die Saccharosebeladung ins Phloem und den Volumenfluß dort. Sie scheinen sowohl aus dem Apoplasten als auch aus den Zellen der Keimblätter ins Phloem beladen zu werden, wobei die maximale Rate nicht sehr hoch ist (maximal $0,55 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Keimling}^{-1}$). Bei Überangebot aus dem Xylem akkumuliert Kalium folglich in den Keimblättern. Die über das Phloem exportierten Kalium-Ionen werden kaum im *sink* festgelegt sondern zirkulieren (bis zu 80 %). Das Verhältnis Phosphat zu Phosphor insgesamt beträgt in den Keimblättern mit Endosperm 0,6, gleiches findet man im Siebröhrenexsudat wieder. Nach Transfer in phosphathaltiges Medium ist anteilig mehr Phosphat in den Keimblättern vorhanden, zusätzlich wird nun mengenmäßig mehr Phosphor über das Phloem exportiert. Nur ein Überangebot an externem, apoplastischem Phosphat verhindert einen Netto-Verlust von organisch-gebundenem Phosphor aus den Keimblättern. Eine Zirkulation von Phosphat zwischen Phloem und Xylem konnte zwar gefunden werden, jedoch ist sie in ihrem Ausmaß gering. Nach Angebot von Phosphat über die Wurzel kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der

Phosphatflüsse im Xylem, aber zu keiner Phosphorakkumulation in den Keimblättern. Erfolgt die Phosphorzufuhr gleichzeitig über den Keimblattapoplasten und über die Wurzel sind die Massenflüsse in den Leitbahnen im Vergleich zu den Einzelinkubationen reduziert. Der Phosphattransport im Keimling wird somit hauptsächlich durch das Phosphatangebot an der Wurzel und den Phosphateintrag in die Wurzel (über das Phloem) bestimmt. Die Sulfataufnahme in die Keimblätter ist schon bei relativ geringen apoplastischen Konzentrationen maximal, anders verhält es sich mit der Phloembeladung. Dies läßt den Schluß zu, daß sich der/die Carrier an den Parenchymzellen (Mesophyll) in ihren Raten unterscheiden. 70 % der über das Phloem exportierten Sulfat-Ionen zirkulieren zwischen Phloem und Xylem. Die Sulfat-Assimilation scheint gleichzeitig in den Keimblättern und der Wurzel zu erfolgen. Dafür spricht auch die Feststellung, daß nach Angebot über die Wurzel der Xylemfluß und der Phloemfluß deutlich reduziert sind.

Glutamin, Phosphat, Sulfat und Kalium-Ionen treten in weit höheren Konzentrationen in den Keimblättern auf als sie im Siebröhrenexsudat nachweisbar sind. Neben der apoplastischen scheint auch eine symplastische Phloembeladung dieser Substrate möglich. Um Hinweise über den Beladungsweg des Phloems zu gewinnen, wurde die Versorgung des Keimlings mit Substraten aus dem apoplastischen Raum zwischen dem Endosperm und der Unterseite der Keimblättern unterbrochen. Bleibt die Nachlieferung aus dem apoplastischen Raum und über die Wurzel aus, kommt es bei Kalium, Phosphat und Sulfat spätestens nach drei Tagen, trotz beträchtlicher intrazellulärer Gehalte, zum Erliegen der Netto-Translokation aus den Keimblättern. Dies läßt auf eine rein apoplastische Beladung des Phloems schließen. Stickstoffverbindungen werden weiterhin aus den Zellen des Phloems bzw. den Geweben entlang des Transportweges ins Phloem entlassen (symplastisch). Die Netto-Translokation aus den Keimblättern kommt auch nach längerem N-Mangel nicht zum Erliegen. Ob der Grund für dieses duale Verhalten der Substrate bei der Beeinflussung der apoplastische beladenden Carrier oder bei der massiven Veränderung des Turgors (Massenfluß im Phloem) zu suchen ist, bleibt noch unklar.

Allgemein wird durch diese Untersuchungen deutlich, welche z.T. katastrophale Auswirkungen bestimmte apoplastische Bedingungen auf die Prozesse in einer Pflanze haben können (untersucht am Beispiel eines *source*-Organes, dem Keimblatt). Dabei handelt es sich nicht nur um ein lokales Phänomen, es ist auch der Ferntransport und somit alle Teile des Kormus betroffen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Apoplast, obwohl es sich um ein totes Gewebe handelt, einen entscheidenden Beitrag an den Transportprozessen innerhalb der Blätter aber auch der Wurzel hat.

6 Summary

The nutrient concentration in the leaf is regulated by several interdependent fluxes. The aim of this work was to measure and to balance nutrient fluxes between leaf apoplast, leaf tissue, phloem and xylem after equilibrating a defined substrate concentration in the apoplast. Fluxes of the following major nutrients were analysed in 6 day old seedlings of *Ricinus communis* L.: carbon (sucrose), nitrogen (glutamine), potassium (ion), phosphorus (phosphate) and sulfur (sulfate).

External sucrose is taken up into the cotyledons and loaded into the phloem from the apoplast. Both processes are saturated under *in vivo* conditions. Independent of the concentration in the apoplast, 30 % of the external sucrose remains in the cotyledons and the apical hypocotyl, 70 % are translocated into the *sink*. There is no recirculation of sucrose from the *sink* back to the cotyledons via xylem. The exported sucrose is almost completely utilized in the *sink*. Concentration of hexoses (glucose and fructose) in the xylem does not depend on the apoplastic sucrose concentration and the transported amounts are negligible for plant nutrition. Glutamine in the apoplast is taken up into the cotyledons and loaded into the phloem. At low concentration export via the phloem is favoured. It appears that the phloem glutamine uptake-mechanism(s) operate with higher affinity than the mechanism(s) responsible for uptake into the mesophyll. In this situation which may represent nitrogen deficiency, glutamine is used in the *sink* organs. At higher glutamine concentration, glutamine exported via the phloem is completely recirculated via the xylem. The major part of nitrate added to the root is presumably-reduced there and imported into the cotyledons from the root via the xylem and leads to an increased glutamine export in the phloem.

Potassium ions have a major effect on sucrose loading and volume flow within the phloem. Potassium ions transported in the phloem are taken up from the apoplast or are loaded from the symplast. The maximum phloem export capacity is low. After export out of the cotyledons potassium is hardly utilized in the *sink* but circulates back (up to 80 %). An additional supply to the root caused increased xylem flux and led to an accumulation of potassium within the cotyledons. Under *in vivo*-conditions the ratio phosphate to total phosphorus is the same in the endosperm, cotyledons and in the sieve tube-sap (about 0.6). Equilibrating the apoplast with different concentrations of phosphate led to an increase of this ratio. Only at high phosphate concentration in the apoplast the net loss of phosphate out of the cotyledons was prevented. Phosphate exported in the phloem was recirculated in the xylem but to a minor extent. Phosphate offered to the root led to an increase of the mass flow within the xylem but not to an accumulation of phosphate within the cotyledons. An simultaneous incubation of phosphate via the cotyledons and via the root decrease the mass flow within the phloem and also the mass flow within the xylem. This was considered as a hind for a predominant metabolic control based on the phosphate status of the roots affecting the uptake of external phosphate and the import via the phloem. Sulfate uptake into the cotyledons was saturated at low apoplastic concentration. However, the capacity for

sulfate loading into the phloem was higher. It appears that the phloem sulfate uptake-mechanism(s) operate with higher affinity than the mechanism(s) responsible for uptake into the mesophyll. 70 % of the phloem exported sulfate ions circulate via phloem and xylem. Sulfate assimilation occurred within the cotyledons but also within the root tissue. The reduction of the mass flows (phloem and xylem) after equilibration via the roots leads to the same conclusion.

Glutamine, phosphate, sulfate and potassium ions are found in higher concentrations within the cotyledons than in the sieve tube-exudate. A completely symplastic phloem loading pathway can be considered. To get more information about the involved pathway for phloem loading (apoplastic or symplastic), the supply of these nutrients from the endosperm was interrupted. Within a period of 3 days, net translocation of potassium, phosphorus and sulfur out of the cotyledons stopped though abundant amounts of these substrate were still present in the cotyledons. The explanation is a predominant loading via the apoplast. Nitrogen containing substrates behaved in a different manner. Removal of endosperm supply did not prevent phloem export out of the *source* into *sink*.

In conclusion, the control of apoplastic nutrient concentration plays an important role for nutrient allocation between the leaf tissue and the root. The apoplastic substrate concentration in the leaf not only controls nutrient fluxes within the leaf but impacts all parts of the plant via fluxes through the phloem and the xylem.

7 Literaturverzeichnis

- Allen, S. & Raven, J.A. (1987): Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: The role of long distance transport. J. Exp. Bot. 38, 580-596.
- Ames, B.N. (1966): Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In: Meth. Enzymol. 8, 115-118. Eds. Neufeld und Ginsburg. Academic Press, New York San Francisco London.
- Andersen, P.C.; Brodbeck, B.V.; Mizell, R.F. (1993): Water stress- and solution-mediated changes in water relations and amino acids, sugar in xylem of *Prunus salicina* and *Lagerstroemia indica*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120, 36-42.
- Antognoni, F.; Fornale, S.; Grimmer, C.; Komor, E.; Bagni, N. (1998): Long distance transport of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L.. Planta 204, 520-527.
- Armstrong, M.J. & Kirkby, E.A. (1979): Estimation of potassium recirculation in tomato plants by comarison of potassium and calcium accumulation in the tops with their fluxes in the xylem stream. Plant Physiol. 63, 1143-1148.
- Atkins, C. (2000): Biochemical aspects of assimilate transfers along the phloem path: N-solutes in lupins. Aust. J. Plant Physiol. 27, 531-537.
- Baker, D.A., Malek, F.; Devhar, F.D. (1980): Phloem loading of amino acids from petioles of *Ricinus* leaves. Ber. Dtsch. Ges. 93, 203-209.
- Balane, S.G. (1997): Regulation des Stärke- und Zuckermetabolismus in der Wachstumszone des Hypokotyls des Rizinuskeimlings. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Bellaloui, N.; Brown, P.H.; Dandekar, A.M. (1999): Manipulation of *in vivo* sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. Plant Physiol. 119, 735-742.
- Bennett, M.J.; Marchant, A.; Green, H.G.; May, S.T.; Ward, S.P.; Millner, P.A.; Walker, A.R.; Schulz, B.; Feldmann, K.A. (1996): The *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. Science 273, 948-950.
- Bhatti, A.S.; Steinert, S.; Sarwar, G.; Hilpert, A.; Jeschke, W.D. (1993): Ion distribution in relation to leaf age in *Leptochloa fusca* L. Kunth (kallar grass). I. K, Na, Ca and Mg. New Phytol. 123, 539-545.
- Bick, J.-A.; Neelam, A.; Hall, J.L.; Williams, L.E. (1998a): Amino acid carriers of *Ricinus communis* expressed during seedling development: molecular cloning and expression analysis of two putative amino acid transporters, RcAAP1 and RcAAP2. Plant Mol. Biol. 36, 377-385.

- Bick, J.-A.; Neelam, A.; Smith, E.; Nelson, S.J.; Hall, J.L.; Williams, L.E. (1998b): Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. Plant Mol. Biol. 38, 425-435.
- Biddulph, O.; Biddulph, S.F.; Cory, R.; Koontz, H. (1958): Circulation pattern for P^{32} , S^{35} and Ca^{45} in the bean plant. Plant Physiol. 33, 293-300.
- Black, C.C.; Mustardy, L.; Sung, S.S.; Kormanik, P.P.; Xu, D.P.; Paz, N. (1987): Regulation and roles for alternative pathways of hexoses metabolism in plants. Physiol. Plant. 69, 387-394.
- Blevins, D.G.; Lukaszewski, K.M. (1998): Boron structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 481-500.
- Bogges, A. (1976): Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. Plant Physiol. 58, 398-404.
- Bonas, U.; Schmitz, K.; Rennenberg, H.; Bergmann L. (1982): Phloem transport of sulfur in *Ricinus*. Planta 155, 82-88.
- Bormann, J. (1988): Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. TINS 11, 112-116.
- Bowling, D.J.F. & Weatherley, P.E. (1965): The Relationship between transpiration and potassium uptake in *Ricinus communis*. J. Exp. Bot. 16, 732-741.
- Brauer, M.; Zhong, W.J.; Jelitto, T.; Schobert, C.; Sanders, D. Komor, E. (1998): Free calcium ion concentration in the sieve tube sap of *Ricinus communis* L. seedlings. Planta 206, 103-110.
- Brunold, C. & Suter, M. (1989): Localization of enzymes of assimilatory sulfate reduction in pea plants. Planta 179, 228-234.
- Bun-Ya, M.; Nishimura, M.; Harashima, S.; Oshima Y. (1991): The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. Mol. Cell Biol. 11, 322-328.
- Bush, D.S. & Mc Coll, J.G. (1987): Mass-action expressions of ion exchange applied to Ca^{2+} , H^{+} , K^{+} and Mg^{2+} sorption on isolated cell walls of leaves from *Brassica oleracea*. Plant Physiol. 85, 247-260.
- Bush, D.R. (1993): Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 513-542.
- Canny, M.J. (1988): Bundle sheath tissues of legume leaves as a site of recovery of solutes from the transpiration stream. Physiol. Plant. 73, 457-464.
- Canny, M.J. & Mc Cully, M.E. (1989): The xylem sap of maize roots: its collection, composition and formation. Aust. J. Plant Physiol. 15, 557-566.
- Canny, M.J. (1995): Apoplastic water and solute movement: New rules for an old space. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 46, 215-236.
- Cataldo, D.A.; Mc Fadden, K.M.; Garland, T.R.; Wildung, R.E. (1988): Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean exudates. Plant Physiol. 86, 734-739.

- Chapleo, S. & Hall J.L. (1989): Sugar unloading in roots of *Ricinus communis* L.. II. Characteristics of the extravascular apoplast. *New Phytol.* 111, 381-390.
- Chin, C.; Lee, M.; Weinstein, M (1981): Some characteristics of the sucrose of excised tomato roots. *Can J. Bot.* 59, 1159-1163.
- Chiou, T.J. & Bush, D.R. (1998): Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4784-4788.
- Christy, L.A. & Ferrier, J.M. (1973): A mathematical treatment of Münch's pressure flow hypothesis of phloem translocation. *Plant Physiol.* 11, 251-317.
- Clarkson, D.T. (1985): Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 77-115.
- Clarkson, D.T.; Hawkesford, M.J.; Davidian, J.-C. (1993): Membrane, long-distance transport of sulfate. In: *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*. Eds. De Kok, L.J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C.; Rauser, W.E.. pp. 3-19. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing.
- Craft, A.S. & Broyer, T.C. (1938): Migration of salts and water into the xylem of roots of higher plants. *Amer. J. Bot.* 24, 415-431.
- Daram, P.; Brunner, S.; Rausch, C.; Steiner, C.; Amrhein, N.; Bruchner, M. (1999): Pht2,1 encodes a *low affinity*-phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2153-2166.
- De Boer, A.H.; Katou, K.; Mizuno, A.; Kojima, H. ; Okamoto, H. (1985): The role of electrogenic xylem pump in K^+ absorption from the xylem of *Vigna unguiculata*: the effect of auxin an fusiococcin. *Plant Cell Environ.* 8, 579-586.
- Dietz, K.-J., Schramm, M.; Lang, B.; Lanz-Schramm, A.; Dürr, C.; Martinoia, E. (1992): Characterization of the epidermis of barley primary leaves: II. The role of the epidermis in ion compartmentation. *Planta* 187, 431-437.
- Down, R.J. & Hellmers, H.(1975): *Environmental and the Experimental Control of Plant Growth.*, Academic Press, New York.
- Engels, C. & Marschner, H. (1992): Adaptation of potassium translocation into the shoot of maize (*Zea mays*) to shoot demand: Evidence for xylem loading as a regulating step. *Physiol. Plant* 86, 263-268.
- Epstein, E. (1972): *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*, Wiley, New York.
- Eschrich, W. (1980): Free Space Invertase, its possible role in phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93, 363-378.
- Eschrich, W. (1984): Untersuchungen zur Regulation des Assimilattransports. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 97, 5-14.
- Fankhauser, H. & Brunhold C. (1978): Localization of adenosine 5' phosphosulfate sulfotransferase in spinach leaves. *Planta* 143, 285-289.

- Fischer, W.: Andre, B.; Rentsch, D.; Krolkiewicz, S.; Tegeder, M.; Breitzkreuz, K.; Frommer, W.B. (1995): Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 188-195.
- Franz, F. (1994): Ektomykorrhizen der Fichte: Identifizierung, Ultrastruktur und Mikroelementanalyse (EELS, ESI). Dissertation, Universität Bayreuth.
- Freundling, C.; Starrach, N.; Flach, D.; Gradmann, D.; Mayer, W.E. (1988): Cell walls as reservoirs of potassium ions reversible volume changes of pulvinar motor cells during rhythmic leaf movements. *Planta* 175, 193-203.
- Fricke, W. Leigh, R.A.; Tomos, A.D. (1994): Concentrations of inorganic and organic solutes in extracts from individual epidermis, mesophyll and bundle-sheath cells of barley leaves. *Planta* 192, 310-316.
- Fritz, E. (1980): Microautoradiographic localization of assimilates in phloem: problems and new methods. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93, 109-121.
- Fritz, E. (1989): X-ray microanalysis of diffusible elements in plant cells after freeze-drying, pressure with ether and embedding in plastic. *Scanning Microsc.* 3, 517-526.
- Fritz, E. & Jentschke, G. (1994): Agar standards for quantitative X-ray microanalysis of resin-embedded plant tissues. *J. Microsc.* 174, 47-50.
- Gamalei, Y. (1991): Phloem loading and its development related to plant evolution from trees and herbs. *Trees* 5, 50-64.
- Garcia-Perez, A. & Burg, M.B. (1991): Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolarity. *J. Membr. Biol.* 119, 1-13.
- Geigenberger, P.; Langenberger, S.; Wilke, J.; Heineke, D.; Heldt, H.W.; Stitt, M. (1993): Sucrose is metabolised by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 190, 446-453.
- Geiger, D.R.; Sovonick, S.A.; Shock, T.L.; Fellows, R.J. (1974): Role of free space in translocation of sugar beet. *Plant Physiol.* 54, 892-898.
- Giaquinta, R.T. (1983): Phloem loading of sucrose. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34, 347-387.
- Grignon, C. & Sentenac, H. (1991): pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 103-126.
- Grimm, E.; Bernhardt, G.; Rothe, K.; Jacob, F. (1990): Mechanism of sucrose retrieval along the phloem path: a kinetic approach. *Planta* 182, 480-485.
- Grimmer, C. & Komor, E. (1999): Assimilate export by leaves of *Ricinus communis* L. growing under normal and elevated carbon dioxide concentrations: the same rate during the day, the different rate at night. *Planta* 209, 275-281.
- Grodzinski, B.; Jiao, J.; Leonardos, E.D. (1998): Estimating photosynthesis and concurrent export rates in C₃ and C₄ species at ambient and elevated CO₂. *Plant Physiol.* 117, 207-215.
- Hall, S.M. & Baker, D.A. (1972): The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. *Planta* 106, 131-140.

- Hayes, P.M.; Patrick, J.W.; Offler, C.E. (1987): The cellular pathway of radial transfer of photosynthates in stems of *Phaseolus vulgaris* L.: Effects of cellular plasmolysis and p-chloromecuribenzenesulphonic acid. *Ann. Bot.* 59, 635-642.
- Hayashi, H. & Chino, M. (1985): Nitrate and other anions in the rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 26, 325-330.
- Hayashi, H.; Okado, Y.; Mano, H.; Kune, T.; Matsushashi, S.; S-Ishioka, N.; Uchida, H. Chino, M. (1997): Detection and characterization of nitrogen circulation through the sieve tubes and xylem vessels of rice plants. *Plant Soil* 196, 233-237.
- Hein, C.; Springael, J.Y.; Volland, C.; Haguenaer-Tsapis, R.; Andre, B. (1995): NPII, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 und Fur4 permeases, encodes the Rap5 ubiquitin-protein ligase. *Molec. Microbiol.* 18, 77-87.
- Heizmann, U.; Kreuzwieser, J.; Schnitzler, J.-P.; Brüggemann N.; Rennenberg, H. (2001): Assimilate transport in the xylem sap of pedunculate oak (*Quercus robur*) saplings. *Plant Biol.* 3, 132-138.
- Hellmann, H.; Barker, L.; Funck, D.; Frommer, W.B. (2000): The regulation of assimilate allocation and transport. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 583-594.
- Hendrix, A. (1990): Carbohydrates and carbohydrate enzymes in developing cotton ovules. *Physiol. Plant.* 78, 85-92.
- Herschbach, C. & Rennenberg, H. (1994): Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 45, 1069-1076.
- Hoff, T.; Truong, H.N.; Caboche, M. (1994): The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 17, 489-506.
- Holfelder, M.G.A.H.; Steck, M.; Komor, E.; Seifert, K.H. (1998): Ricinine in phloem sap of *Ricinus communis*. *Phytochem.* 47, 1461-1463.
- Huber, S.C. & Moreland, D.E. (1981): Co-transport of potassium and sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 67, 163-169.
- Jeschke, W.D.; Atkins, C.A.; Pate, J.S. (1985): Ion circulation via phloem and xylem between root and shoot of nodulated white lupin. *J. Plant Physiol.* 117, 319-330.
- Jeschke, W.D.; Pate, J.S.; Atkins, C.A. (1986): Partitioning of K⁺, Na⁺, Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ through xylem and phloem to component organs of nodulated white lupin under mild salinity. *J. Plant Physiol.* 128, 77-93.
- Jeschke, W.D. & Pate, J.S. (1991a): Ionic interactions of petiole and lamina during the life of a leaf of castor bean *Ricinus communis* L. under moderately saline conditions. *J. Exp. Bot.* 42, 1051-1064.
- Jeschke, W.D. & Pate, J.S. (1991b): Modelling of the partitioning, assimilation and storage of nitrate within root and shoot organs of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J. Exp. Bot.* 42, 1091-1103.

- Jeschke, W.D. & Pate, J.S. (1991c): Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant of *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. J. Exp. Bot. 42, 1105-1116.
- Jeschke, W.D.; Klagges, A. Hilpert, A.; Bhatti, S.; Sarwar, G. (1995): Partioning and flow of ions and nutrients in salt-treated plants of *Leptochloa fusca*. L. Kunth. I. Cations and chloride. New Phytol. 130, 23-35.
- Jeschke, W.D.; Kirkby, E.A.; Peuke, A.D.; Pate, J.S.; Hartung, W. (1997): Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). J. Exp. Bot. 48, 75-91.
- Kallarackal, J.; Orlich, G.; Schobert, C.; Komor, E. (1989): Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. Planta 177, 327-335.
- Karley, A.J.; Leigh, R.A.; Sanders, D. (2000): Differential ion accumulation and ion fluxes in the mesophyll and epidermis of barley. Plant Physiol. 122, 835-844.
- Kauss, H. (1987): Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. 38, 47 -72.
- Kirkby, E.A. & Armstrong, M.J. (1980): Nitrate uptake in roots as regulated by nitrate assimilation in the shoots of castor oil plants. Plant Physiol. 65, 286-290.
- Koch, K.E. (1996): Carbohydrate modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 509-540.
- Köckenberger, W. (1995): Wasser- und Nährstofftransport im Keimling von *Ricinus communis* L.– Eine Erfassung der Flüsse durch Modellierung und Anwendung zerstörungsfreier NMR-Bildgebungsmethoden. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Köckenberger, W.; Pope, J.M.; Xia, Y.; Jeffrey, K.R.; Komor, E.; Callaghan, P.T. (1997): A non-invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear magnetic resonance microimaging. Planta 201, 53-63.
- Köhler, B. & Raschke, K. (2000): The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. Plant Physiol. 122, 243-254.
- Köhler, J. (1992): Die Bedeutung der verschiedenen Gewebe des Keimblattes von *Ricinus communis* L. für die Aufnahme von Saccharose und anderer im Phloem transportierter Stoffe. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Kombrink, E. & Beevers, H. (1983): Transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides from endosperm to cotyledons in germinating castor bean seedlings. Plant Physiol. 73, 370-376.
- Komor, E. (1977): Sucrose uptake by cotyledones of *Ricinus communis* L.: Characteristics, mechanism and regulation. Planta 137, 119-131.
- Komor, E.; Liegl, I.; Schobert, C. (1993): Loading and translocation of various cytokinins in phloem and xylem of the *Ricinus communis* L.. Planta 191, 252-255.

- Komor, E.; Orlich, G.; Weig, A.; Köckenberger, W. (1996): Phloem loading - not metaphysical, only complex: towards an unified model of phloem loading, *J. Exp. Bot.* 47, 1155-1164.
- Kreuzwieser, J.; Herschbach, C.; Rennenberg, H. (1996). Sulfate uptake and xylem loading of non-mycorrhizal excised roots of young *Fagus sylvatica* trees. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 409-416.
- Kriedemann, P. & Beevers, H. (1967a): Sugar uptake and translocation in the castor bean seedling. I. Characteristics of transfer in intact and excised seedlings. *Plant Physiol.* 42, 161-173.
- Kriedemann, P. & Beevers, H. (1967b): Sugar uptake and translocation in the castor bean seedling. II. Sugar transformations during uptake. *Plant Physiol.* 42, 174-180.
- Kronzucker, H.J.; Glass, A.D.M.; Siddiqi, M.Y. (1995): Nitrate induction in spruce: an approach using compartmental analysis. *Planta* 196, 683-690.
- Kuhn, A.J.; Bauch J.; Schröder, W.H. (1995): Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* 168/169, 135-150.
- Kühn, C.; Franceschi, V.R.; Schulz, A.; Lemoine, R.; Frommer, W.B. (1997): Localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements indicate macromolecular trafficking. *Science* 275, 1298-1300.
- Kwart, M.; Hirner, B.; Hummel, S.; Frommer, W.B. (1993): Differential expression of two related amino-acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4, 993-1002.
- Lalonde, S.; Boles, E.; Hellmann, H.; Barker, L.; Patrick, J.W.; Frommer, W.B.; Ward, J.M. (1999): The dual function of carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11, 707-726.
- Langenberger, S. (1994): Untersuchung zum Stofffluß in Siebröhren von *Ricinus communis* Keimlingen. Zulassungsarbeit, Universität Bayreuth.
- Larsson, C.M.; Larsson, M.; Purves, J.V.; Clarkson, D.T. (1991): Translocation and cycling through roots of recently absorbed nitrogen and sulphur in wheath (*Triticum aestivum*) during vegetative and generative growth. *Physiol. Plant.* 82, 345-352.
- Lass, B. & Ullrich-Eberius, C.I. (1984): Evidence for proton/sulfate co-transport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta* 161, 53-60.
- Lee, R.B. & Ratcliff, R.G. (1993): Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: Measurements with ³¹P-NMR. *J. Exp. Bot.* 44, 587-598.
- Leggewie, G.; Willmitzer, L.; Riesmeier, J.W. (1997): Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9, 381-392.
- Lehmann, J. (1981): Quantitative Bestimmung von Nucleotiden und Zuckerphosphaten im Phloem-Exsudat. *J. Plant Physiol.* 102, 415-424.

- Leigh, R.A. & Wyn-Jones, W.R.G. (1984): A hypothesis relation critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* 97, 1-13.
- Leigh, R.A. & Storey, R. (1993): Intercellular compartmentation of ions in barley leaves in relation to potassium nutrition and salinity. *J. Exp. Bot.*, 44, 755-762.
- Liu, C.; Muchhal, U.S.; Uthappa, M.; Kononowicz, A.K.; Raghothama, K.G. (1998): Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphor. *Plant Physiol.* 116, 91-99.
- Lohaus, G.; Winter, H.; Riens, B.; Heldt, H.W. (1995): Further studies of phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytoplasmic compartment and in the sieve tubes. *Bot Acta* 108, 270-275.
- Lohaus, G.; Büker, M.; Hußmann, M. Soave, C.; Heldt, H.-W. (1998): Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagines in the Illinois Low Protein and Illinois High Protein strains of maize. *Planta* 205, 181-188.
- Long, J.M. & Widders, J.E. (1990): Quantification of apoplastic potassium content by elution analysis of leaf lamina tissue from pea (*Pisum sativum* L. cv Argenteum). *Plant Physiol.* 94, 1040-1047.
- Lott, J.N.A.; Randall, P.J.; Goodchild, D.J.; Craig, S. (1985): Occurrence of globoid crystals in cotyledonary protein bodies of *Pisum sativum* as influenced by experimentally induced changes in Mg, Ca and K Contents of seeds. *Aust. J. Plant Physiol.* 12, 341-353.
- Maathuis, F.J.M.; Sanders, D.; Gradmann, D. (1997): Kinetics of high-affinity K⁺ uptake in plants, derived from K⁺-induced changes in current-voltage relationships. A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta* 203, 229-236.
- Madore, M.A. & Lucas, W.J. (1987): Control of photoassimilate movement in source-leaf tissue of *Ipomoea tricolor* Cav.. *Planta* 171, 197-204.
- Marschner, H. (1995): Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press Inc. London.
- Marscher, H.; Kirkby, E.A.; Engels, C. (1997): Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. *Bot Acta* 110, 265-273.
- Marten, S.; Hoth, S.; Deeken, R.; Ache, P.; Ketchum, K.A.; Hoshi, T.; Hedrich, R. (1999): AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7581-7586.
- Matt, D.; Schurr, U.; Klein, D.; Krapp, A.; Stitt, M. (1998): Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugar, altered diurnal changes in the Nia transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. *Planta* 207, 27-41.
- Miller, M.E. & Chourey, P.S. (1992): The maize invertase – deficient miniature – A seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* 4, 297-305.

- Mimura, T.; Dietz, K.-J.; Kaiser, W.; Schramm, M.J.; Kaiser, G.; Heber, U. (1990): Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180, 139-146.
- Mimura, T.; Yin, Z.-H.; Wirth, E.; Dietz, K.-J. (1992): Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. *Plant Cell Physiol.* 33, 563-568.
- Mimura, T. (1995): Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol.* 36, 1-7.
- Mimura, T.; Sakano, K.; Shimmen, T. (1996): Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Environ.* 19, 311-320.
- Mizuno, K.; Kojimo, H.; Katou, K.; Okamoto, H. (1994): The electrogenic proton pumping from parenchyma symplast into xylem – direct demonstration by xylem perfusion. *Plant Cell Environ.* 8, 525-529.
- Mohr, W.P. & Cocking, E.C. (1968): A method for preparing highly vacuolated senescent or damaged plant tissue for ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.* 21, 171-181.
- Münch, E. (1930): *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Verlag Fischer, Jena.
- Nelson, D.E.; Rammesmayer, G.; Bohnert, H.J. (1998): Regulation of cell specific inositol metabolism and transport in plants salinity tolerance. *Plant Cell* 10, 753-764.
- Nelson, D.E.; Koukoumanos, M.; Bohnert, H.J. (1999): *Myo*-Inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol.* 119, 165-172.
- Oliveira, I.C. & Coruzzi, G.M. (1999): Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121, 301-309.
- Olt, S.; Krötz, E.; Komor, E.; Rokitta, M.; Haasa, A. (2000): ^{23}Na and ^1H NMR Microimaging in plants. *J. Magn. Res.* 144, 297-304.
- Orlich, G. & Komor, E. (1992): Phloem loading in *Ricinus* cotyledons: sucrose pathways via the mesophyll and the apoplasm. *Planta* 187, 460-474.
- Orlich, G.; Hofbrückl, M.; Schulz, A. (1998): A symplastic flow of sucrose contributes to phloem loading in *Ricinus* cotyledons. *Planta* 206, 108-116.
- Orlich, G. (1998): Analysis of the driving forces of phloem transport in *Ricinus* seedlings: sucrose export and volume flow are determined by source. *Planta* 206, 266-271.
- Passioura, J.B. (1988) : Water transport in and to roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 39, 245-265.
- Pate, J.S. (1965): Roots as organs of assimilation of sulfate. *Science* 149, 547-548.
- Pate, J.S. (1975): Exchange of solutes between phloem and xylem and circulation in the whole plant. In: *Encyclopaedia of Plant Physiology, Transport in Plants*. Vol. I. Phloem transport, Eds. M.H. Zimmermann, J.A. Milburn, pp.451-473. Springer-Verlag Berlin.

- Pate, J.S.; Laycell, D.B. McNeil, D.L. (1979): Modelling the transport and utilization of carbon in a modulated legume. *Plant Physiol.* 62, 730-738.
- Pate, J.S.; Laycell, D.B.; Atkins, C.A. (1983): Xylem und phloem transport and the functional economy of carbon and nitrogen of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71, 835-840.
- Patonnier, M.P.; Peltier, J.P.; Marigo, G. (1999) : Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *J. Exp. Bot.* 50, 1223-1229.
- Patrick, J.W. (1990): Sieve element unloading: cellular pathway, mechanism and control. *Physiol. Plant.* 78, 298-308.
- Patrick, J.W. (1997): Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48, 191-222.
- Peterson, C.A.; Emanuel, M.E.; Humphreys, G.B. (1981): Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Can. J. Bot.* 59, 618-625.
- Peterson, C.A.; Murrmann, M.; Steudle, E. (1993): Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L.. *Planta.* 190, 127-136.
- Peuke, A.D. & Jeschke, W.D. (1993): The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L.. I. Growth with ammonium and nitrate as nitrogen source. *J. Exp. Bot.* 44, 1167-1176.
- Pitman M.G. (1982): Transport across plant roots. *Q. Rev. Biophys.* 15, 481-554.
- Poirier, Y.; Thoma, S.; Somerville, C.; Schiefelbein, J. (1991): A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* 97, 1087-1093.
- Porter, A.G.; Knievel, P.D.; Shannon, C.J. (1987): Assimilate unloading from maize (*Zea mays* L.) pedicel tissue. *Plant Physiol.* 85, 558-565.
- Pouteau, S.; Cherel, I.; Vaucheret, H.; Caboche, M. (1989): Nitrate reductase messenger RNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. *Plant Cell* 1, 1111-1120.
- Raghothama, G.H. (2000): Phosphate transport and signalling. *Curr. Opinion Plant Physiol.* 3, 182-187.
- Reinhold, L. & Kaplan, A. (1984): Membrane transport of sugars and amino acids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 45-83.
- Rennenberg, H.; Schmitz, K.; Bergmann, L. (1979): Long distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 147, 57-62.
- Rennenberg, H. (1982): Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem.* 21, 2771-2781.
- Rennenberg, H. (1984): The fate of excess sulfur in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 121-153.

- Renosto, F.H.C.; Patel, R.L.; Martin, C.; Thomassian, G.; Zimmermann, I., Segel, H. (1993): ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosolic enzymes from spinach leaf. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 272-275.
- Rentsch, D.; Hirner, B.; Schmelzer, E.; Frommer, W.B. (1996): Salt stress-induced proline transporters and stress-repressed broad specificity amino acid permease genes identified by suppression of an amino acid transport targeting mutant. *Plant Cell* 8, 1437-1446.
- Rentsch, D.; Boorer, K.J.; Frommer, W.B. (1998): Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J. Membr. Biol.* 162, 177-190.
- Richardson, P.T.; Baker, D.A.; Ho, L.C. (1982): The chemical composition of cucurbit vascular exudates. *J. Exp. Bot.* 33, 1239-1247.
- Rick, R.; Dörge, A.; Thureau, K. EM (1982). Quantitative analysis of electrolytes in frozen dried sections *J. Microsc.* 125, 239-247.
- Riesmeier, J.W.; Willmitzer, L.; Frommer, W.B. (1994): Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO* 13, 1-7.
- Robinson, S.P. & Beevers, H. (1981a): Evidence of amino-acid:proton cotransport in *Ricinus* cotyledons. *Planta* 152, 527-533.
- Robinson, S.P. & Beevers, H. (1981b): Amino acid transport in germinating castor bean seedlings. *Plant Physiol.* 68, 560-566.
- Roitsch, T.B.; Bittner, M.; Godt, D.E. (1995): Induction of apoplastisc invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 108, 285-295.
- Russell, R.S. & Shorrocks, V.M. (1959): The relationship between transpiration and the absorption of inorganic ions by intact plants. *J. Exp. Bot.* 10, 301-316.
- Sakuth, T.; Schobert, C.; Pecsevaradi, A.; Eichholz, A.; Komor, E.; Orlich, G. (1993): Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L.: separation, characterization and *in vivo*-labelling. *Planta* 191, 207-213.
- Satoh, S.; Lizuka, C.; Kikuchi, A.; Nakamura, N.; Fujii, T. (1992): Proteins and carbohydrates in xylem sap from spauish roots. *Plant Cell Physiol.* 33, 841-847.
- Sauer, N.; Friedländer, K.; Gräml-Wicke, U. (1990): Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO* 9, 3045-3050.
- Sauer, N. (1997): Sieve elements and companion cells- extreme division of labour. *TIPS* 2, 285-286.
- Schachtmann, D.P.; Reid, R.J.; Ayling, S.M. (1998): Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116, 447-453.
- Scheffer, F. & Schachtschabel, P. (1989): Lehrbuch der Bodenkunde. 12. Aufl.. Eds. Schachtschabel, P.; Blume, H.-P.; Brümmer, G.; Hartge, K.-H.; Schwertmann, U..Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

- Scheible, W.R.; Gonzales-Fontes, A.; Lauerer, M.; Müller-Röber, B.; Caboche, M.; Stitt, M. (1997): Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9, 783-798.
- Schobert, C. (1988): Stickstoffaufnahme und Stickstofftransport im *Ricinus*keimling. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Schobert, C. & Komor, E. (1989): The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as shown by analysis of sieve-tube sap. *Planta* 177, 342-349.
- Schobert, C. & Komor, E. (1990): Transfer of amino acids and nitrate from the roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. *Planta* 181, 85-90.
- Schobert, C. & Komor, E. (1992): Transport of nitrate and ammonium into the phloem and xylem of *Ricinus communis* seedlings. *J. Plant Physiol.* 140, 306-309.
- Schobert, C.; Zhong W.J.; Komor, E. (1998): Inorganic ion modulate the path of phloem loading of sucrose in *Ricinus communis* L. seedlings. *Plant Cell Environ.* 21, 1047-1054.
- Schramel, P.; Wolf, A.; Klose, B.-J. (1980): Analytical pretreatment of biological material by wet-ash methods. In: Trace elements. Eds. Bratter, P.; Schrammel, P.. Analytical chemistry in medicine and biology. W. De Gruyter, Berlin.
- Schreiber, L.; Breiner, H.-W.; Riederer, M.; Dieggelin, M.; Guggenheim, R. (1994): The Casparian strip of *Clivia miniata* Reg. roots: Isolation, fine structure and chemical nature. *Bot. Acta* 107, 353-361.
- Schupp, R.; Glavac, V.; Rennenberg, H. (1991): Thiol composition of xylem sap of beech trees. *Phytochem.* 30, 1415-1418.
- Schurr, U. & Gebauer, G. (1989): Aminosäureanalyse mit OPA-Vorsäulenderivatisierung. Seite 6. In: Kontron Instruments (Hrsg.) Applikation, Information; Kommunikation.
- Schurr, U. (1991): Die Wirkung von Bodentrockenheit auf den Xylem- und Phloemtransport von *Ricinus communis* und deren Bedeutung für die Interaktion zwischen Wurzel und Spross. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Shelp, B.J.; Brown, A.W.; Mc Lean, M.D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *TIPS* 11, 446-452.
- Smith, F.W.; Rae, A.L.; Haweskesford, M.J. (2000): Molecular mechanism of phosphate and sulfate transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 236-245.
- Smith, I.K. (1975): Sulfate transport in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 55, 303-307.
- Smith, J.A.C. & Milburn, J.A. (1980a): Osmoregulation and the control of phloem sap composition in *Ricinus communis* L.. *Planta* 148, 28-34.
- Smith J.A.C. & Milburn, J.A. (1980b): Phloem transport, solute flux and the kinetics of sap exudation in *Ricinus communis* L.. *Planta* 148, 35-41.
- Smith, J.A.C. & Milburn, J.A. (1980c): Phloem turgor and the regulation of sucrose loading in *Ricinus communis* L.. *Planta* 148, 42-48.

- Speer, M. & Kaiser, W.M. (1991): Ion relations in symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinach oleacea* L. und *Pisum sativum* L. under salinity. *PlantPhysiol.* 97, 990-997.
- Steudle, E. & Peterson, C.A. (1998): How does water get through roots?. *J. Exp. Bot.* 49, 775-788.
- Sunarpi, J.G.K. & Anderson, J.W. (1996): Distribution and redistribution of sulfur supplied as [³⁵S] sulfate to roots during vegetative growth of soybean. *Plant Physiol.* 110, 1151-1157.
- Sung, S.S.; Xu, W.P.; Black, C.C. (1989): Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiol.* 89, 1171-1121.
- Takahashi, H.; Watanabe-Takahashi, A.; Smith, F.W.; Blake-Kalff, M.; Hawkesford, M.J., Saito, K. (2000): The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23, 171-182.
- Tanner, W. & Beevers, H. (1990): Does transpiration have essential function in long-distance ion transport in plants? *Plant Cell Environ.* 13, 745-750.
- Thayer, J.R. & Huffaker, R.C. (1980): Determination of nitrate and nitrit by high-pressure liquid chromatography: comparison with other methods from nitrate determination. *Analyt. Biochem.* 102, 110-119.
- Thomas, B.R. & Rodriques, R.L. (1994): Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* 106, 1235-1239.
- Thorens, B. (1996): Glucose transporters in regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Amer. J. Physiol.* 270, 541-553.
- Tillard, P.; Passama, L.; Gojon, A. (1998): Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO₃-uptake in *Ricinus communis* plants? *J. Exp. Bot.* 49, 1371-1379.
- Turgeon, R. (1996): Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* 1, 403-441.
- Van Bel, A.J.E. (1987): The apoplast concept of phloem loading has no universal validity. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 677-686.
- Van Bel, A.J.E. (1989): The challange of symplastic phloem loading. *Bot. Acta* 102, 183-185.
- Van Beusichem, M.L.; Kirkby, E.A.; Baas, R. (1988): Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 86, 914-921.
- Versa, W.K. (1995): A phosphate repressible, high-affinity phosphate permease is encoded by the pho-5+ gene of *Neurospora crassa*. *Gene* 153, 135-139.
- Verscht, J.; Kalusche, B.; Köhler, J.; Köckenberger, W.; Metzler, A.; Haase, A.; Komor, E. (1998): The kinetics of sucrose concentration in the phloem of individual vascular bundles of the *Ricinus communis* seedling measured by nuclear magnetic resonance microimaging. *Planta* 205, 132-139.
- Voitsekhovskajsa, O.; Pakhomomova, M.; Syutkina, A.V.; Gamalei, Y.V.; Heber, U. (2000): Compartmention of assimilate fluxes in leaves. II. Apoplastic sugar levels in leafs of plants with different companion cells types. *Plant Biol.* 2, 107-112.

- Vreughdenhil, D. & Koot-Gronsveld, E.A.M. (1989): Measurements of pH, sucrose and potassium ions in the phloem sap of castor bean (*Ricinus communis*) plants. *Physiol. Plant.* 77, 385-388.
- Ward, J.; Kühn, C.; Tegeder, M.; Frommer, W.B. (1998): Sucrose transport in plants. *Int. Rev. Cytol.* 178, 41-47.
- Wegner, L.H. & Raschke, K. (1994): Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots. *Plant Physiol.* 105, 799-813.
- Wegner, L.H. & De Boer, A.H. (1999): Activation kinetics of the K(+) outward rectifying conductance (KORC) in xylem parenchyma cells from barley roots. *J. Membr. Biol.* 170, 103-119.
- Weibull, J.; Ronquist, F.; Brishammar, S. (1990): Free amino acid composition of leaf exudates and phloem sap. *Plant Physiol.* 92, 222-226.
- Williams, M.L.; Thomas, B.J.; Farrar, J.F.; Pollock, C.J. (1993): Visualizing the distribution of elements within barley leaves by energy dispersive x-ray maps (EDX Maps). *New Phytol.* 125, 367-372.
- Wilson, T.P.; Canny, M.J.; Mc Cully, M.E. (1988): Proton pump activity in bundle sheath tissues of broad-leaved trees in relation of leaf age. *Physiol. Plant* 73, 465-470.
- Winter, H.; Lohaus, G.; Heldt, H.W. (1992): Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic level in barley leaves. *Plant Physiol.* 99, 996-1004.
- Wolf, O. & Jeschke, W.D. (1988): Effect of sodium chloride salinity on growth, development, ion distribution and ion translocation in castor bean *Ricinus communis* L.. *J. Plant Physiol.* 132, 45-53.
- Wolf, O.; Munns, R.; Tonnet, M.L.; Jeschke, W.D. (1990): Concentrations and transport of solutes in xylem and phloem along the leaf axis of NaCl-treated *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 41, 1133-1141.
- Ziegler, H. (1975): Nature of transported substances. In: *Transport in plants*. Eds. M.H. Zimmermann, J.A. Milburn. *Encyclop. Plant Physiol. New Series Vol. 1*, 59-100. New York; Springer Verlag, Berlin.
- Zimmermann, M.H. & Ziegler, H. (1975): Appendix III. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: *Transport in plants*. Eds. M.H. Zimmermann, J.A. Milburn. *Encyclop. Plant Physiol. New Series Vol. 1*, 480-503. Springer Verlag, New York Berlin.
- Zhong, W.J. (1993): Transport of magnesium ions in the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 190, 114-119.
- Zhong, W.J. (1994): Transport von Mineralstoffen und Abszissinsäure im Phloem des Keimlings von *Ricinus communis* L. und ihre Wirkung auf den Saccharosetransport. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Zhong, W.; Hartung, W.; Komor, E.; Schobert, C. (1996): Phloem transport of abscisic acid in *Ricinus communis* L. seedlings. *Plant Cell Environ.* 19, 471-474.

- Zhong, W.J.; Kaiser, W.; Köhler, J.; Bauer-Ruckdeschel, H.; Komor, E. (1998): Phloem loading of inorganic cations and anions by the seedling of *Ricinus communis*. J. Plant Physiol. 152, 328-335.

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Ewald Komor für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung dieser Arbeit.

Dr. Christian Schobert für die freundliche Überlassung sehr interessanter Daten über die Lokalisierung verschiedenen Elemente in den Keimblättern und für unendlich vieles mehr. In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn Dr. Eberhard Fritz (Universität Göttingen) für die Durchführung dieser Messungen.

Marga Wartinger für die geduldige Einführung in die HPLC-Messung. Auch danke ich den anderen technischen Assistenten des Lehrstuhls Pflanzenökologie und des BITÖKs die ich häufiger mit Arbeit überschüttete.

Dr. Arnd-Jürgen Kuhn und Dr. Walter Schröder für LAMMA- und SIMS-Messungen. Dr. habil. Gerhard Gebauer für seine Hilfe bei den ^{15}N -Messungen und die engagierte Diskussion der Ergebnisse.

Markus Hofbrückl für die Bestimmung der Glutaminaufnahme bzw. des –effluxes. Libuse Badewitz für die zeichnerische Darstellung der Blattquerschnitte.

Dr. Alfons Weig für seine Vielzahl aufmunternder Kommentare.

Udo Jongebloed, der mich stets daran erinnerte, daß der Apoplast ein toter Raum ist. Frank Buhr und Christiane Jakob, daß ich auch noch ein Stück des Schreibtisches behalten durfte. Frank Keller, für das Gefühl: Es geht noch schlimmer.

Maren, Daniel, Pia, Shi-Long, Uli D., Uli S., Hans, Christiane, Sebastian, Frank H. und der Heizung im NWI ... für die schönen Momente. Tran Dang Khoa, der mich zum Leiter einer internationalen Arbeitsgruppe machte.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die warmherzige Unterstützung und die freundliche Atmosphäre.

Meinem Mann Klaus für das Verständnis, die Geduld und die Hilfe bei den täglichen Mühen.

Diese Arbeit wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den

Heike Bauer-Ruckdeschel

